

MAYLLA RODRIGUES LUCENA

Associação entre doses elevadas de ácido fólico com ativação de linfócitos T, B e NK e suas possíveis consequências no processo inflamatório em indivíduos saudáveis

Tese apresentada à Escola Paulista de Medicina - Universidade Federal de São Paulo para obtenção do título de DOUTOR em Ciências

**São Paulo  
2019**

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Prof. Antonio Rubino de Azevedo,  
Campus São Paulo da Universidade Federal de São Paulo, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

**Lucena, Maylla Rodrigues**

Associação entre doses elevadas de ácido fólico com ativação de linfócitos T, B, e NK e suas possíveis consequências no processo inflamatório em indivíduos saudáveis / Maylla Rodrigues Lucena. - São Paulo, 2019. XVII, 91f.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Programa de Pós-Graduação em Medicina (Hematologia e Oncologia) .

Título em inglês: Association between high folic acid doses and T, B and NK lymphocytes activation and possible implications in the inflammatory process of healthy individuals.

1. ácido fólico. 2. suplementação . 3. linfócitos . 4. sistema imune . 5. citocinas .

MAYLLA RODRIGUES LUCENA

Associação entre doses elevadas de ácido fólico com ativação de linfócitos T, B, e NK e suas possíveis consequências no processo inflamatório em indivíduos saudáveis

**Orientadora:** Profa. Dra. Elvira Maria Guerra-Shinohara

**Programa de Pós-Graduação em Medicina (Hematologia e Oncologia) da Escola Paulista de Medicina da Federal de São Paulo UNIFESP/EPM.**

**São Paulo  
2019**

MAYLLA RODRIGUES LUCENA

Associação entre doses elevadas de ácido fólico com ativação de linfócitos T, B e NK e suas possíveis consequências no processo inflamatório em indivíduos saudáveis

**Chefe do Departamento:**

Profa. Dra. Maria Stella Figueiredo

**Coordenadora do Curso de Pós-Graduação (Hematologia/Oncologia):**

Profa. Dra. Gisele Wally Braga Colleoni

**São Paulo  
2019**

MAYLLA RODRIGUES LUCENA

Associação entre doses elevadas de ácido fólico com ativação de linfócitos T, B e NK e suas possíveis consequências no processo inflamatório em indivíduos saudáveis

**Banca Examinadora:**

Profa. Dra. Elvira Maria Guerra-Shinohara

Profa. Dra. Maria Stella Figueiredo

Profa. Dra. Vera Lúcia Blaia D'Avila

Profa. Dra. Rosário Domingues Crespo Hirata

Prof. Dr. Marcelo Gil Cliquet

**Suplentes**

Profa. Dra. Mariana Lazarini

Dr. Thiago Noronha

**São Paulo  
2019**

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

## DEDICATÓRIA

*Dedico:*

*A Deus*

*A minha Mãe e os meus Pais.*

*Este projeto foi desenvolvido com o suporte financeiro do CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brasília/DF, Brasil, Processo 401586/2014-6); da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (**Processo 2016/18854-4**) e bolsa CAPES (doutorado).*



## **AGRADECIMENTOS**

A minha orientadora, Prof. Dra. Elvira Maria Guerra-Shinohara por sua dedicação e empenho com meu crescimento com profissional durante toda minha pós-graduação.

Ao Programa de pós-graduação da Disciplina de Hematologia e Hemoterapia, da Universidade Federal de São Paulo pela oportunidade da realização do doutorado.

Ao meu parceiro de pesquisa Guilherme Wataru, que esteve comigo durante toda a realização deste trabalho, dividindo pacientes, amostras e a vida de pós-graduando, pela paciência e compreensão com toda a turbulência em minha vida pessoal, por chorar meu choro comigo e resistir aos meus altos e baixos até o último momento deste trabalho. Muito obrigada.

Aos meus grandes amigos, Clovis e Juliano que se tornaram amigos para toda vida, pelo compartilhamento de toda a angustia no decorrer da evolução da minha tese, sendo meu ponto de equilíbrio ao longo desses 4 anos e me mostrando sempre que existe o melhor caminho e não me deixando esquecer a viver um dia de cada vez.

Aos colegas de laboratório, Patricia Mendonça, Carol Thaissa, Janaína Pascoal, Cecília Palchetti, Marcela Bach Pietro, por ajudaram não apenas no desenvolvimento desta tese, mas por estarem sempre presentes, amenizando os dias mais difíceis.

Aos Alunos de Iniciação Científica do Laboratório, Paloma Nascimento e Gabriela Vicente pela colaboração nas coletas e experimentos. Vocês mais me ensinaram do que aprenderam. Obrigada!

Ao Professor Dewton e a Farmacêutica Renata, por toda atenção, carinho e paciência na padronização e ajuste de todo ensaio de citometria de fluxo realizada neste trabalho. Sem toda dedicação de vocês e amor pelo que fazem, esse trabalho não seria possível.

Ao meu Pai e a Juciléia, pelo apoio incondicional e por sempre acreditarem no meu sucesso.

Às minhas irmãs Sarah e Marina, que por uma ligação inexplicável, sentiram tantas emoções ao meu lado. Que sempre que precisei, estiveram presencialmente aqui em São Paulo comigo.

Aos meus irmãos, Mario Jr, Maria Clara, Greyce, Marcel e João Lucas por toda nossa cumplicidade e apoio. Sem vocês nada teria sentido.

A minha mãe e meu padrinho, sem o apoio financeiro, emocional e motivacional de vocês, eu jamais teria conseguido chegar até aqui. Muito obrigada pela paciência, por sempre me fazerem acreditar que tudo é possível. Por terem embarcado nesse sonho comigo e por nunca me desampararem ou me deixassem entristecer ou desistir.

## RESUMO

LUCENA, M. R. **Associação entre doses elevadas de ácido fólico com ativação de linfócitos T, B e NK e suas possíveis consequências no processo inflamatório em indivíduos saudáveis**. 91 p. Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2019.

**INTRODUÇÃO:** O folato é uma vitamina do complexo B que tem um papel importante na divisão celular devido a sua participação na síntese de DNA e RNA. No Brasil, a maioria das formulações farmacêuticas de ácido fólico (AF) usada por mulheres que tem intenção de engravidar e pacientes com anemias hemolíticas tem a dose de 5 mg, quantidade superior ao limite tolerável de ingestão dessa vitamina para indivíduos saudáveis. Atualmente existe uma preocupação a respeito do uso de altas doses de AF, uma vez que o consumo excessivo de AF tem sido associado ao aumento das concentrações de folato no organismo, bem como ao aparecimento de uma fração não metabolizada (UMFA). Não é conhecido se existe associação entre as concentrações elevadas de folato e de UMFA com alterações na ativação e proliferação de linfócitos T, B e NK.

**OBJETIVO:** Avaliar a associação entre o consumo de doses elevadas de AF com a ativação e proliferação de linfócitos T, B e NK e verificar se existe alterações nas expressões de RNAm e de citocinas em indivíduos saudáveis.

**METODOLOGIA:** Trinta e quatro indivíduos saudáveis fizeram uso de 5mg/dia de AF durante 90 dias. As coletas de sangue foram realizadas antes (*baseline*) e após 45 e 90 dias de uso diário de 5 mg de AF. Foram avaliados: folato sérico e eritrocitário, UMFA e outras formas de folato; vitamina B<sub>12</sub>; ensaios de ativação de linfócitos T, B e NK com PMA e o ionomicina; concentrações séricas de interleucina (IL)-6, IL-8, IL-10, interferon gama (IFN- $\gamma$ ) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ); expressões do RNAm dos genes de DHFR, MTHFR, IFNG, TNFA, IL8 e IL6.

**RESULTADOS:** Foram observadas maiores concentrações de folato sérico, eritrocitário, UMFA, e 5-metiltetraidrofolato após 45 e 90 dias de uso de AF quando comparado ao *baseline*. O número de linfócitos T CD4+ aumentou, e o de linfócitos T CD8+ diminuiu após 90 dias de uso de AF em relação ao *baseline* e após 45 dias. Após 90 dias, também foi observada diminuição do número de linfócitos B/HLA-DR+ e NK/CD38+ após estímulo com PMA e ionomicina.

**CONCLUSÃO:** O uso de 5 mg/dia de AF por indivíduos saudáveis foi associado ao aumento das concentrações circulantes de folato, bem como ao aumento do número de linfócitos T CD4+ e diminuição dos linfócitos T CD8+. Após a ativação dos linfócitos com PMA e o ionomicina, houve uma associação entre o uso de AF e redução da expressão CD38 das NK após 90 dias, e redução do HLA-DR nos linfócitos B após 45 dias de intervenção.

**Palavras-chave:** ácido fólico, suplementação, linfócitos, sistema imune, citocinas

## ABSTRACT

LUCENA, M. R. **Association between high folic acid doses and T, B and NK lymphocytes activation and possible implications in the inflammatory process of healthy individuals.** 91 p. Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2019.

**BACKGROUND:** Folate is a B-complex vitamin with an important role on cell replication since its involvement in DNA and RNA synthesis. In Brazil, most pharmaceutical formulations of folic acid (FA) taken by women who intend to get pregnant and hemolytic anemia patients contain 5 mg, which is higher than tolerable upper intake level of this vitamin for healthy subjects. Currently, there is a concern about intake of high doses of FA, once high consumption of FA has been associated to higher folate concentrations on the body, as well as appearance of an unmetabolized fraction (UMFA). Elevated concentrations of folate and UMFA seem to be implied with changes on immunity.

**AIM:** To assess the association between high doses of FA intake with activation of T, B and NK lymphocytes, and to investigate the possible implications in the inflammatory process in healthy individuals.

**METHODS:** 34 healthy subjects make use of 5mg/day of FA during 90 days. Blood samples were collected at baseline and after 45 and 90 days of FA use. It was assessed: serum and RBC folate, UMFA and other folate forms; vitamin B12; T, B and NK cell activation assays; serum concentrations of interleukin (IL)-6, IL-8, IL-10, interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) and tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ).

**RESULTS:** Higher serum and RBC folate, UMFA and 5-methyltetrahydrofolate concentrations were observed after 45 and 90 days of FA use when compared to baseline. Number of T CD4+ cells increased, and T CD8+ cells decreased after 90 days of FA use regarding to baseline and 45 days. After 90 days, decreased number of B cells/HLA-DR+ and NK cells/CD38+ after PMA and ionomycin stimulation were observed.

**CONCLUSIONS:** Intake of 5 mg/ day of FA by healthy individuals was associated to increased circulating concentrations of folate, as well as increased number of T CD4+ cells and decreased T CD8+ cells. In addition, our data show relation between FA use and decrease on B and NK cells activation.

**Keywords:** folic acid, supplementation, lymphocytes, immune system, cytokines.

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Implementação das políticas de fortificação e concentrações de ácido fólico em alguns países .....	26
<b>Tabela 2.</b> Citocinas da imunidade inata, principal fonte celular e principais alvos celulares e efeitos biológicos .....	36
<b>Tabela 3.</b> Características gerais dos 34 indivíduos saudáveis incluídos no estudo..	53
<b>Tabela 4.</b> Parâmetros hematológicos e bioquímicos de 34 indivíduos saudáveis antes e após o uso de 5 mg de ácido fólico por 90 dias .....	54
<b>Tabela 5.</b> Concentrações das vitaminas nos indivíduos saudáveis antes da intervenção e após 45 e 90 dias de uso diário de 5mg de ácido fólico .....	55
<b>Tabela 6.</b> Número de eventos dos linfócitos após incubação sem ativação nos indivíduos saudáveis antes e após o uso de 5 mg/dia de ácido fólico .....	57
<b>Tabela 7.</b> Número de eventos dos linfócitos após ativação com PMA + ionomicina em indivíduos saudáveis antes e após o uso de 5 mg/dia de ácido fólico .....	57
<b>Tabela 8.</b> Concentrações de marcadores de processo inflamatório em 34 indivíduos saudáveis antes e após 45 e 90 dias de intervenção com ácido fólico 5mg/dia .....	65
<b>Tabela 9.</b> Modelos de regressão linear univariados para a variável dependente número de eventos de células NK <sup>1</sup> sem ativação.....	66
<b>Tabela 10.</b> Modelos de regressão linear univariados para a variável dependente número de eventos das células NK ativadas dos 34 indivíduos saudáveis .....	66
<b>Tabela 11.</b> Modelos de regressão linear univariados para a variável dependente número de eventos dos linfócitos B sem ativação de 34 indivíduos saudáveis .....	67
<b>Tabela 12.</b> Modelos de regressão linear univariados para a variável dependente número de linfócitos B (eventos) com ativação de 34 indivíduos saudáveis .....	68
<b>Tabela 13.</b> Modelos de regressão linear univariados para a variável dependente número de linfócitos T CD4+ (eventos) sem ativação de 34 indivíduos saudáveis...	68
<b>Tabela 14.</b> Modelos de regressão linear univariados para a variável dependente número de eventos dos linfócitos T CD4+ ativados de 34 indivíduos saudáveis .....	69
<b>Tabela 15.</b> Modelos de regressão linear univariados para a variável dependente número de linfócitos T CD8+ (eventos) sem ativação de 34 indivíduos saudáveis ...	70
<b>Tabela 16.</b> Modelos de regressão linear univariados para a variável dependente número de linfócitos T CD8+ (eventos) com ativação de 34 indivíduos saudáveis ...	71

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estrutura química do ácido fólico .....	18
<b>Figura 2.</b> Absorção intestinal do folato naturalmente presente nos alimentos e do ácido fólico .....	21
<b>Figura 3.</b> Estrutura química de 5-metiltetraidrofolato .....	21
<b>Figura 4.</b> Estrutura química e conversão do diidrofolato a Tetraidrofolato, mostrando a ação da enzima diidrofolato redutase (DHFR), numa reação muito importante para o aproveitamento celular do ácido fólico .....	21
<b>Figura 5.</b> Metabolismo do folato .....	22
<b>Figura 6.</b> Metabolismo do folato mostrando a saturação da enzima diidrofolato redutase (DHFR), levando a um excesso de ácido fólico (AF) sintético circulante (canto superior direito), denominado de ácido fólico não metabolizado .....	28
<b>Figura 7.</b> Esquema do desenho experimental utilizado na quantificação e ativação de linfócitos B, T e NK em indivíduos saudáveis antes e após o uso de 5mg/dia de AF .....	43
<b>Figura 8.</b> Estratégia utilizada para identificação por citometria de fluxo dos linfócitos T .....	46
<b>Figura 9.</b> Estratégia utilizada para avaliação da ativação de linfócitos T. (A) Linfócitos T CD8 <sup>+</sup> ; (B) Linfócitos T CD4 <sup>+</sup> .....	47
<b>Figura 10.</b> Estratégia utilizada para identificação e ativação por citometria de fluxo dos linfócitos B .....	48
<b>Figura 11.</b> Estratégia utilizada para identificação e ativação por citometria de fluxo dos linfócitos NK .....	49
<b>Figura 12.</b> Avaliação das concentrações de folato sérico (A), folato eritrocitário (B) pelo método microbiológico e de folato sérico total (C) e 5-metil-THF (D) por LC-MS/MS .....	56
<b>Figura 13.</b> Número de eventos dos linfócitos sem ativação e com ativação em indivíduos saudáveis antes e após o uso de 5 mg/dia de ácido fólico .....	58
<b>Figura 14.</b> Razão de Linfócitos T CD4 e Linfócitos T CD8 sem ativação e com ativação nos indivíduos saudáveis submetidos ao uso de 5 mg/dia de ácido fólico .....	59
<b>Figura 15.</b> Avaliação da ativação dos linfócitos NK (CD56+/CD16+) utilizando marcadores específicos de ativação HLA-DR (A e B); CD38 (C e D) e CD69 (E e	

F) com DMSO (sem ativação) e PMA + ionomicina (com ativação) ..... 60

**Figura 16.** Avaliação da ativação dos linfócitos B (CD19+) utilizando marcadores específicos de ativação HLA-DR (A e B); CD38 (C e D) e CD69 (E e F) com DMSO (sem ativação) e PMA + ionomicina (com ativação) ..... 61

**Figura 17.** Avaliação da ativação dos linfócitos T (CD4+) utilizando marcadores específicos de CD38 (A e B) e CD69 (C e D) com DMSO (sem ativação) e PMA + ionomicina (com ativação) ..... 62

**Figura 18.** Avaliação da ativação dos linfócitos T (CD8+) utilizando marcadores específicos de CD38 (A e B) e CD69 (C e D) com DMSO (sem ativação) e PMA + ionomicina (com ativação) ..... 63

**Figura 19.** Expressões do RNAm dos genes de DHFR (A), MTHFR (B), IFNG (C), TNFA (D), IL8 (E) e IL6 (F) de indivíduos saudáveis, antes e após 45 e 90 dias de intervenção com 5mg diária de ácido fólico ..... 64

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1.</b> Ingestão Dietética Recomendada (RDA), Necessidade Média Estimada (EAR) e Limite Superior Tolerável de Ingestão (UL) para o folato .....	19
<b>Quadro 2.</b> Marcadores de superfície relacionados à ativação de linfócitos, funções e associação com eventos clínicos .....	33
<b>Quadro 3.</b> Características dos anticorpos utilizados nos painéis segundo as fluorescências, fornecedores e referência .....	44
<b>Quadro 4.</b> Marcadores celulares de ativação e de viabilidade para cada tipo de linfócitos .....	45
<b>Quadro 5.</b> Características dos ensaios Taqman® empregados para avaliação da expressão dos genes <i>DHFR</i> , <i>MTHFR</i> , <i>IFNG</i> , <i>TNFA</i> , <i>IL8</i> e <i>IL6</i> .....	50
<b>Quadro 6.</b> Características dos ensaios Taqman® empregados para avaliação da expressão dos genes de referência candidatos pela técnica de PCR em tempo real .....	51



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>AF</b>	Ácido fólico
<b>CEP</b>	Comitê de Ética em Pesquisa
<b>DFTN</b>	Defeitos de fechamento do tubo neural
<b>DHL</b>	Desidrogenase láctica
<b>EAR</b>	<i>Estimated Average Requirement</i>
<b>FAD</b>	Flavina adenina dinucleotídeo
<b>FR</b>	Receptor de folato
<b>FSC</b>	<i>forward scatter</i>
<b>FVS780</b>	<i>Fixable Viability Stain 780</i>
<b>GCPII</b>	Glutamato carboxipeptidase II
<b>HLA-DR</b>	<i>Human Leukocyte antigen DR</i>
<b>Hcy</b>	Homocisteína
<b>IFN</b>	Interferon
<b>IL</b>	Interleucina
<b>IL-6</b>	Interleucina-6
<b>IL-8</b>	Interleucina-8
<b>IL-10</b>	Interleucina-10
<b>IFN-γ</b>	Interferon-γ
<b>MTHFD1</b>	Metilenotetraidrofolato desidrogenase
<b>MTHFR</b>	Metilenotetraidrofolato redutase
<b>MTR</b>	Metionina sintase
<b>MTRR</b>	Metionina sintase redutase
<b>NK</b>	<i>Natural killer</i>
<b>PCRus</b>	Proteína C reativa ultrassensível
<b>PLP</b>	Piridoxal-5'-fosfato
<b>PMA</b>	12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato
<b>RDA</b>	<i>Recommended Dietary Allowance</i>
<b>RFC1</b>	Carreador de folato reduzido
<b>SHMT</b>	Serina hidroximetiltransferase
<b>SSC</b>	<i>Side scatter</i>

**TCLE** Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

**tHcy** Homocisteína total

**THF** Tetraidrofolato

**TNF- $\alpha$**  Fator de necrose tumoral  $\alpha$

**TNF- $\beta$**  Fator de necrose tumoral  $\beta$

**Treg** Linfócito T regulatório

**UL** *Tolerable Upper Intake Level*

**UMFA** *Unmetabolized serum folic acid*

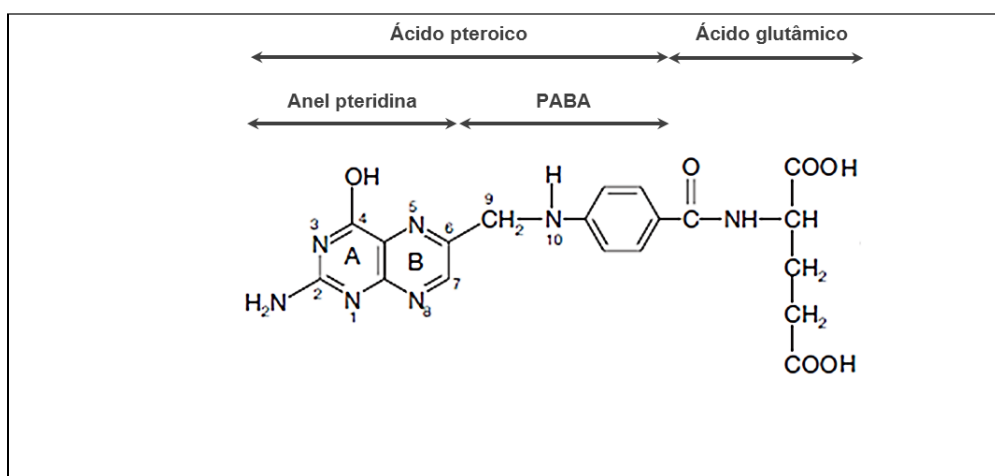
## Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	18
1.1 Absorção e metabolismo .....	22
1.2 Deficiência de folato .....	23
1.3 Fortificação de alimentos com ácido fólico.....	25
1.4 Sobrecarga de Folato.....	26
1.5 Ativação de linfócitos e a resposta imune.....	29
1.6 Citocinas inflamatórias .....	34
1.7 Possíveis efeitos do ácido fólico .....	37
2. OBJETIVO.....	39
2.1 Objetivo geral.....	39
2.2 Objetivos Específicos.....	39
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	40
3.1 Casuística.....	40
3.1.1 Aspectos éticos.....	30
3.2 Métodos.....	41
3.2.1 Amostras.....	41
3.2.2 Determinação de hemograma, contagem de reticulócitos, proteína C reativa ultrassensível (PCRus) e desidrogenase láctica (DHL) .....	41
3.2.3 Determinação das concentrações de folato sérico e eritrocitário e de vitamina B12.....	41
3.2.4 Dosagem de ácido fólico não metabolizado (UMFA) e formas de folato.....	42
3.2.5 Isolamento de leucócitos mononucleares.....	43
3.2.6 Quantificação e ativação de linfócitos B, T, NK em indivíduos saudáveis antes e após o uso de 5mg/dia de AF .....	43
3.2.7 Determinação de expressão de RNAm .....	49
3.2.8 Determinação das concentrações séricas das citocinas inflamatórias .....	50
3.2.9 Análises estatísticas.....	52
4. RESULTADOS.....	53
4.1 Determinação da ativação e proliferação dos linfócitos obtida por citometria de fluxo.....	57
4.2 Dosagem das citocinas séricas.....	65
4.3 Regressões Lineares univariadas .....	66
5. DISCUSSÃO.....	72
6.CONCLUSÃO.....	79
Referências bibliográficas.....	80

## 1 INTRODUÇÃO

O folato é uma vitamina hidrossolúvel do complexo B (vitamina B<sub>9</sub>). É um micronutriente que participa de reações importantes no organismo, como a transferência de grupamentos metil, sendo essencial para a duplicação celular. Além disso, atua na síntese de purinas e timidilato, bem como da conversão de homocisteína (Hcy) a metionina (Kim, 2007).

O termo folato é usado para denominar compostos com estruturas químicas e propriedades nutricionais semelhantes ao ácido fólico (AF), porém na forma de poliglutamato (com 2 a 8 resíduos de ácido glutâmico) (Talaulikar e Arulkumaran, 2011). Já a forma sintética AF, apresenta uma estrutura de monoglutamato (**Figura 1**), e é usada em suplementos vitamínicos, na terapêutica e na fortificação de alimentos, sendo a forma mais oxidada e possuindo maior estabilidade que os poliglutamatos presentes nos alimentos de origem natural (Eichholzer *et al.*, 2006; Caudill, 2010).



**Figura 1.** Estrutura química do ácido fólico.

Adaptado de (Zhao *et al.*, 2009)

Os seres humanos e outros mamíferos não podem sintetizar o AF, devendo obter essa vitamina de fontes exógenas através de seu consumo diário (Kim, 2007). As principais fontes de folato são os vegetais de folhas verdes como brócolis, alface, espinafre e aspargos, além de frutas cítricas, feijões, cereais secos, grãos integrais, ovos, fígado, entre outros (Talaulikar and Arulkumaran, 2011).

Os valores de Referências de Ingestão Dietética: Recomendação Dietética, (*Recommended Dietary Allowance* – RDA), Necessidade Média Estimada (*Estimated Average Requirement* – EAR) e Limite Superior Tolerável de Ingestão (*Tolerable Upper Intake Level* – UL) para o folato estão representadas no **Quadro 1** (Institute and Medicine, 1998).

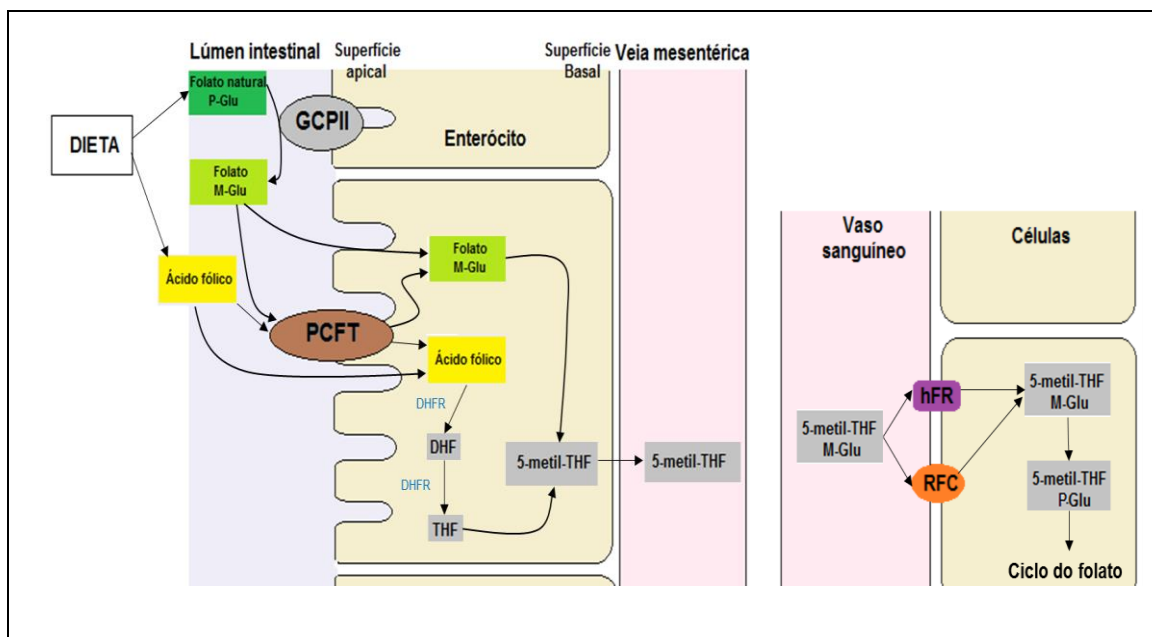
**Quadro 1.** Ingestão Dietética Recomendada (RDA), Necessidade Média Estimada (EAR) e Limite Superior Tolerável de Ingestão (UL) para o folato

Faixa etária	Sexo <sup>a</sup>	RDA <sup>b</sup>	EAR <sup>b</sup>	UL <sup>b</sup>
0 a 6 meses	F e M	65 <sup>c</sup>	ND <sup>d</sup>	ND <sup>d</sup>
7 a 12 meses	F e M	80 <sup>c</sup>	ND <sup>d</sup>	ND <sup>d</sup>
1 a 3 anos	F e M	150	120	300
4 a 8 anos	F e M	200	150	400
9 a 13 anos	F e M	300	250	600
14 a 18 anos	F e M	400	330	800
19 anos ou mais	F e M	400	320	1.000
<b>Gestantes</b>				
14 a 18 anos	F	600	520	800
19 a 50 anos	F	600	520	1.000
<b>Lactantes</b>				
14 a 18 anos	F	500	450	800
19 a 50 anos	F	500	450	1.000

<sup>a</sup>F: feminino; M: masculino; <sup>b</sup>µg/dia; <sup>c</sup>Não determinado; nesses casos, utiliza-se a ingestão adequada (AI); <sup>d</sup>ND: não determinado. Fonte: Institute of Medicine (1998).

## 1.1 ABSORÇÃO E METABOLISMO

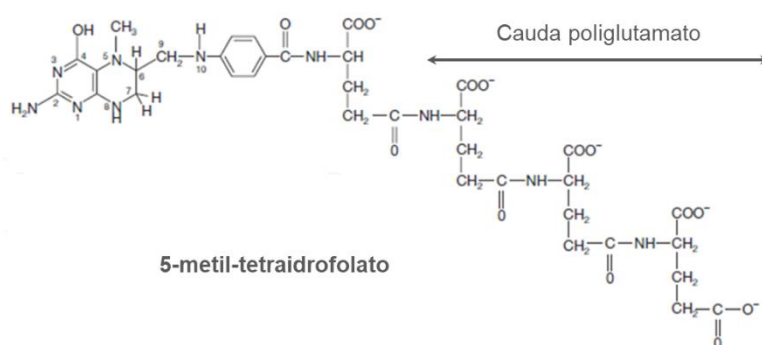
O folato é absorvido principalmente no jejuno proximal. Para que seja absorvido, o folato da dieta, na forma de poliglutamato, deve ser hidrolisado a monoglutamato pela ação da enzima glutamato carboxipeptidase II (GCP II), localizada na membrana apical dos enterócitos (**Figura 2**). A molécula, na sua forma de monoglutamato, é capaz de ser carregada para dentro das células por duas famílias de receptores: o carreador de folato reduzido (RFC1) e os receptores de folato humanos (PCFT) (Kim, 2007; Zhao *et al.*, 2009).



**Figura 2.** Absorção intestinal do folato naturalmente presente nos alimentos e do ácido fólico

Os poliglutamatos são convertidos à monoglutamato pela enzima GCPII. As formas monoglutamato dos alimentos e o ácido fólico sintético são absorvidos através de transportadores PCFT. O ácido fólico é convertido para THF pela diidrofolato redutase. Quando a enzima é saturada, parte do ácido fólico sintético chega a circulação sanguínea não metabolizado. AF: ácido fólico; P-Glu: poliglutamato; M-Glu: monoglutamato; GCPII: glutamato carboxipeptidase II; PCFT: transportador de folato próton-acoplado; DHF: diidrofolato; THF: tetraidrofolato; DHFR: diidrofolato redutase; 5-metil-THF: 5-metil-tetraidrofolato. Adaptado de Paniz, 2015.

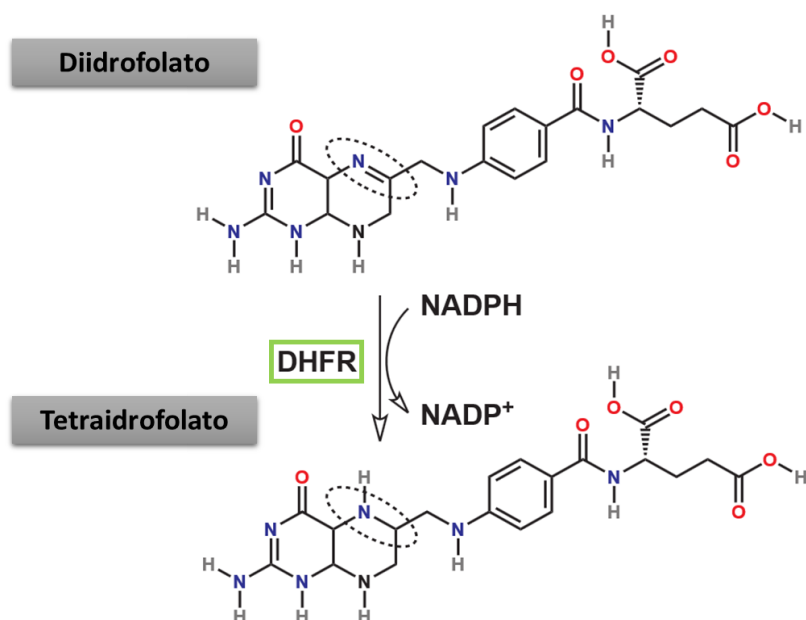
A principal forma de folato na circulação é o 5-metiltetraidrofolato (5-metil-THF). Esta forma é necessária para a remetilação da Hcy à metionina para formação do tetraidrofolato (THF), em numa reação catalisada pela enzima metionina sintase (MTR) e dependente de vitamina B12 na forma de metilcobalamina e vitamina B2 na forma de flavina adenina dinucleotídeo (FAD). A enzima metionina sintase redutase (MTRR) catalisa a redução da vitamina B12 oxidada (cobalamina) a metilcobalamina. A estrutura química do 5-metil-THF está representada na **Figura 3** (Obeid *et al.*, 2013).



**Figura 3.** Estrutura química de 5-metiltetraidrofolato.

Adaptado de (Zhao *et al.*, 2009).

O THF, por sua vez, recebe um grupamento metil da serina em presença da enzima serina hidroximetiltransferase (SHMT) e vitamina B6 na forma de piridoxal 5'-fosfato (PLP), formando 5,10-metilenotHF e glicina. O 5,10-metilenotHF pode ser usado na síntese de timidina, sendo convertido a DHF, que posteriormente será reduzido a THF pela enzima diidrofolato redutase (DHFR) (**Figura 4**) (Xu *et al.*, 2007).

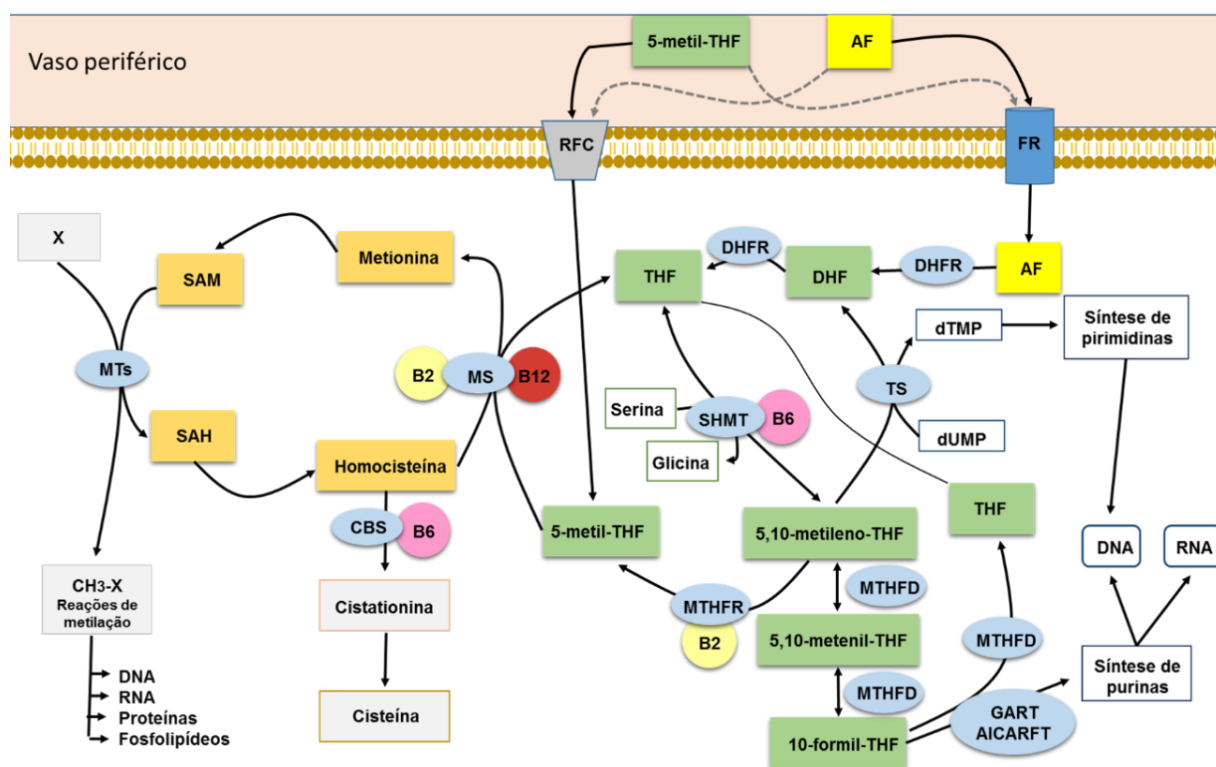


**Figura 4.** Estrutura química e conversão do Diidrofolato a Tetraidrofolato, mostrando a ação da enzima diidrofolato redutase (DHFR), numa reação muito importante para o aproveitamento celular do ácido fólico.

Adaptado de (Zhao *et al.*, 2009).

O 5,10-metilenoTHF pode ainda ser convertido a 5,10-metenilTHF, 10-formilTHF e THF pela ação da enzima metilenotetraidrofolato desidrogenase (MTHFD1). O 5,10-metilenoTHF também pode ser reconvertido a 5-metilTHF na presença da enzima metilenotetraidrofolato redutase (MTHFR), que é FAD dependente. A atividade da MTHFD1 é essencial para síntese do DNA, provendo 10-formilTHF e 5,10-metilenoTHF para síntese *de novo* de purinas e timidilato (**Figura 5**). (Hum *et al.*, 1988; Parle-Mcdermott *et al.*, 2005; Carroll *et al.*, 2009)

A enzima MTHFR é importante na regulação do folato disponível, pois converte 5,10-metileno-THF à 5-metil-THF e com isso ocorre a conversão da homocisteína à metionina (Van Der Linden *et al.*, 2006). A deficiência na atividade da MTHFR vem sendo associada ao aumento das concentrações de homocisteína total (tHcy) (Laanpere *et al.*, 2010a).



**Figura 5.** Metabolismo do folato.

AF: ácido fólico; THF: tetraidrofolato; DHF: diidrofolato; SAM: s-adenosilmetionina; SAH: s-adenosilhomocisteína; RFC: transportador de folato reduzido; FR: receptor de folato humano; B6: vitamina B6; B12: vitamina B<sub>12</sub>; MTHFR: metilenotetraidrofolato redutase; DHFR: diidrofolato redutase; MTHFD: metilenotetraidrofolato desidrogenase; CBS: cistationina β-sintase; MS: metionina sintase; MTs: metiltransferases; SHMT: serina metiltransferase; TS: timidilato sintetase; GART: glicinamida ribonucleotídeo transformilase; AICARFT: 5-amino-imidazol-4-carboxamida ribonucleotídeo transformilase; dUMP, deoxiuridina monofosfato; dTMP, deoxitimidina monofosfato; X: uma variedade de substratos para metilação. Fonte (Paniz, 2015).



## 1.2 DEFICIÊNCIA DE FOLATO

A deficiência de folato pode ocorrer por diferentes causas, como ingestão inadequada, absorção deficiente e aumento das necessidades de consumo (Kim, 2003). Além disso, o alcoolismo, algumas doenças intestinais e o uso de medicamentos antifolato, como o metotrexato, também podem levar à deficiência deste nutriente (Aubard *et al.*, 2000; Eichholzer *et al.*, 2006). São considerados grupos com maior suscetibilidade a deficiência de folato: as mulheres em idade reprodutiva, gestantes, crianças e idosos (Martins, 2011). Dada a importância do folato para a síntese de DNA, sua deficiência afeta principalmente tecidos que necessitam de rápida divisão celular, como tecidos epiteliais do trato gastrointestinal, células hematopoéticas e tumores (Ulrich and Potter, 2006).

A concentração de folato sérico inferior a 3,0ng/mL (6,8 nmol/L) é considerada deficiência de folato. Valores de até 6ng/mL (ou 13,6 nmol/L) são consideradas como provável deficiência. Marcadores funcionais são utilizados em combinação para determinar a deficiência de folato, além das concentrações de folato sérico (<13,6 /L) podem ser utilizadas também as concentrações de homocisteína total (tHcy >13,9 umol/L) e de ácido metilmalônico (MMA)  $\leq$  271 nmol/L (Guerra-Shinohara, 2012).

Para avaliar a concentração de folato no organismo também podemos utilizar como marcador, o folato eritrocitário. Utilizando este marcador, a deficiência de folato é considerada quando as concentrações são menores que 226,5 umol/L (Oms, 2013). A concentração sérica de folato pode ser alterada pelo consumo alimentar nos dias anteriores à coleta do sangue; por isso, é recomendada a determinação concomitante do folato eritrocitário. O folato é acumulado no interior dos eritroblastos durante a eritropoese e permanece no interior dos eritrócitos por aproximadamente 120 dias, tempo que corresponde à vida destas células. Por isso, a concentração de folato eritrocitário é um indicador das concentrações desta vitamina em período retroativo, diferente do folato sérico que mostra o estado atual (Guerra-Shinohara *et al.*, 2007; Piyathilake *et al.*, 2007).

O AF desempenha um papel importante na divisão celular devido a sua participação na síntese de DNA e RNA. A deficiência deste nutriente está intimamente relacionada à anemia, linfocitopenia e granulocitopenia. Os linfócitos e granulócitos desempenham papel essencial na resposta imune devido a migração contínua de células, promovendo interações celulares que permitem ao sistema imunológico executar respostas efetivas. Entretanto, exatamente como a deficiência de folato afeta a distribuição de glóbulos brancos permanece incerta (Abe *et al.*, 2013).

Na gravidez, a crescente demanda da produção de glóbulos vermelhos e o crescimento do feto provocam a diminuição dos estoques de folato materno (Taulikar and Arulkumaran, 2011). A deficiência de folato foi associada em diversos estudos com o aumento do risco de ocorrência de defeitos de fechamento do tubo neural (DFTN) no feto durante a gestação (Kim, 2003; Ulrich and Potter, 2006; Kim, 2007). Os DFTN são malformações congênitas graves do sistema nervoso central que ocorrem como resultado de uma falha no fechamento do tubo neural no início da gestação (24 a 28 semanas após a concepção), e são responsáveis por substancial morbidade e mortalidade de recém-nascidos (Mitchell *et al.*, 2004; Obeid *et al.*, 2013). As principais manifestações de DFTN são anencefalia e espinha bífida. Além destas, a deficiência de folato também está associada com o nascimento de bebês com fenda palatina e lábio leporino (Bower and Stanley, 1989).

É recomendado que mulheres em idade reprodutiva façam uso de suplementos de AF diariamente na dosagem de 400 µg (0,4 mg) antes da concepção a fim de prevenir a ocorrência de DFTN (WHO, 2013). No entanto, como muitas das gestações não são planejadas e o fechamento do tubo neural ocorre nas primeiras semanas de gestação, a suplementação com AF nem sempre atinge o objetivo de prevenir a ocorrência de DFTN.

### 1.3 FORTIFICAÇÃO DE ALIMENTOS COM ÁCIDO FÓLICO

Visando aumentar a ingestão diária de ácido fólico pela população, principalmente pelas mulheres em idade reprodutiva e, dessa forma, reduzir a incidência de DFTN, na década de 90, diversos países adotaram a fortificação de alimentos com essa vitamina (Pacheco *et al.*, 2009). Nos Estados Unidos, a fortificação com ácido fólico iniciou-se em 1998, seguida pelo Canadá e Chile (**Tabela1**) (Nazer *et al.*, 2001; Neuhouser and Beresford, 2001).

Já no Brasil, a fortificação compulsória teve início a partir de julho de 2004, após a publicação da RDC nº 344 de 13 de dezembro de 2002, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. A partir de julho de 2004, as farinhas de trigo e milho passaram a ser fortificadas com 150 µg de AF e 4,2 mg de ferro para cada 100 g de farinha (Brasil, 2002). Em 13 de abril de 2017 foi publicada a RDC nº 150, que atualiza a RDC nº 344 de 2002. Esta atualização estabeleceu um limite mínimo e máximo de adição desses micronutrientes, de forma que as farinhas de trigo e milho deveriam ser fortificadas com 140 a 220 µg de AF e 4 a 9 mg de ferro para cada 100 g de farinha. Essa resolução passa a ser válida decorridos 24 meses da publicação original (Brasil, 2017). As concentrações de AF utilizadas na fortificação de alimentos e o ano de início da implementação em alguns países, incluindo o Brasil, estão apresentadas na **Tabela 1**.

Atualmente, a fortificação de farinhas com AF é mandatória em 47 países, nos continentes da América e Oceania, no Oriente Médio e em alguns poucos países da África. Na Europa há uma resistência em relação a fortificação mandatória de alimentos. Apesar da fortificação voluntária ser permitida na maioria dos países europeus, nenhum tem fortificação mandatória e, recentemente, a União Européia introduziu novas regras para regulamentar a fortificação voluntária de alimentos (Gomes *et al.*, 2016).

**Tabela 1.** Implementação das políticas de fortificação e concentrações de ácido fólico em alguns países

País	Fortificação	Ano de Implementação
Estados Unidos	140 µg/ 100g	1998
Canadá	150 µg/ 100g	1998
Costa Rica	180 µg/ 100g	1998
Chile	220 µg/ 100g	2000
África do Sul	150 µg/ 100g	2003
Brasil	150 µg /100g	2004

Adaptado de Crider *et al.*, 2011.

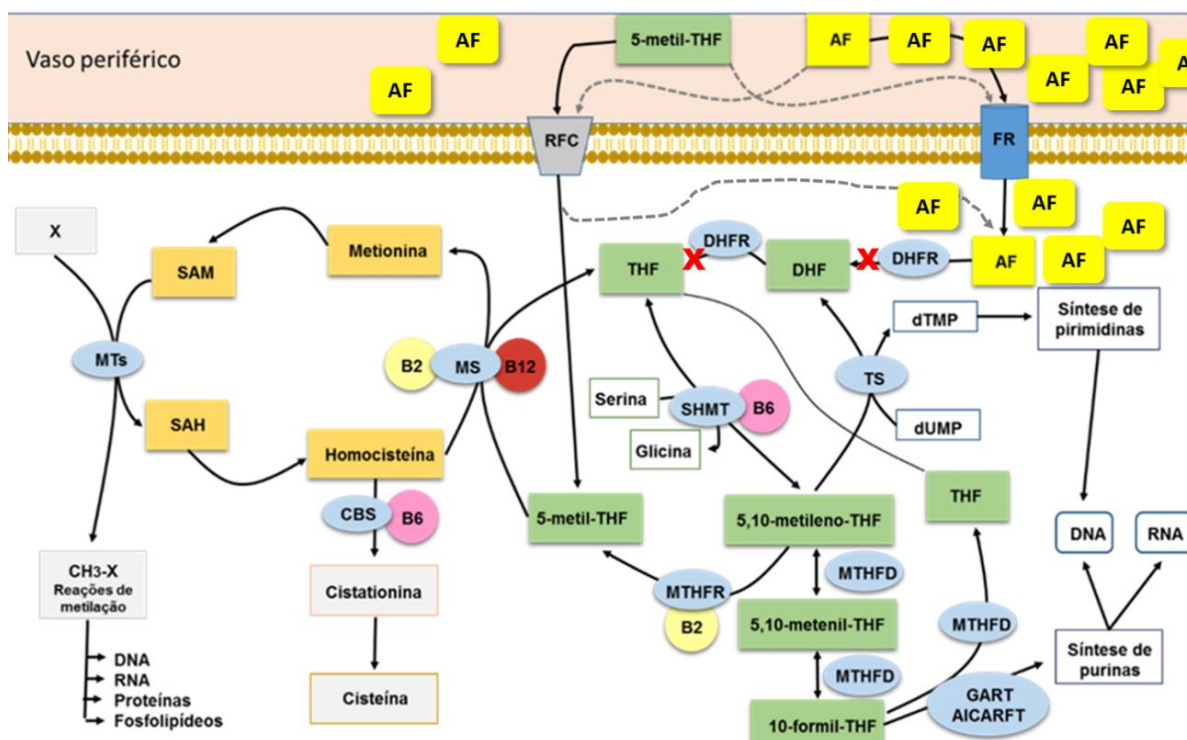
Apesar do sucesso dos programas de fortificação com AF na prevenção de casos de DFTN, muitos estudos têm questionado a fortificação obrigatória dos alimentos. A exposição da maioria da população a altas concentrações de AF por um longo período de tempo tem levado ao aparecimento de altas concentrações séricas de folato em número expressivo de indivíduos avaliados, com concentrações muito acima de valores considerados elevados para indivíduos saudáveis (> 45 nmol/L ou > 20ng/mL) (Paniz *et al.*, 2017; Paniz *et al.*, 2019).

#### 1.4 EXCESSO DE FOLATO

O AF proveniente da fortificação dos alimentos e da suplementação com polivitamínicos tem uma biodisponibilidade mais elevada que os folatos naturais, sendo rapidamente absorvido no intestino (Smith *et al.*, 2008). Assim, a ingestão desta vitamina em sua forma sintética pode resultar em efeitos fisiológicos diferentes dos provocados pelo folato em sua forma natural (Sanderson *et al.*, 2003; Lindzon *et al.*, 2009). Esta biodisponibilidade aumentada do AF sintético pode ser responsável pelo aumento nas concentrações plasmáticas dessa vitamina nas populações submetidas à fortificação (Kim, 2007).

Apesar desta maior biodisponibilidade, o AF sintético só pode ser incorporado no metabolismo celular após ser reduzido pela enzima DHFR. Esta enzima é responsável pela conversão do AF sintético, presente nos suplementos vitamínicos e nos alimentos fortificados, para a forma fisiologicamente ativa do folato (Troen *et al.*, 2006; Van Der Linden *et al.*, 2006; Kalmbach *et al.*, 2008).

Desse modo, a ingestão de AF acima das recomendações nutricionais diárias (1mg/dia) pode acarretar sobrecarga do mecanismo de absorção intestinal (Sweeney *et al.*, 2003; Kalmbach *et al.*, 2008). Em humanos, a expressão e atividade de DHFR em hepatócitos é relativamente baixa e o excesso de AF pode levar à saturação da enzima. Assim, parte do AF absorvido passa a circular sem ser aproveitado pelas células (Sweeney *et al.*, 2003). Este AF que ainda não foi reduzido e que permanece circulando sem entrar no *pool* ativo celular é chamado de AF não metabolizado (UMFA – *Unmetabolized Folic Acid*) (Bailey e Ayling, 2009). A saturação da DHFR com consequente aparecimento de UMFA na circulação está representada na **Figura 6**.



**Figura 6.** Metabolismo do folato mostrando a saturação da enzima diidrofolato redutase (DHFR), levando a um excesso de ácido fólico (AF) sintético circulante (canto superior direito), denominado de ácido fólico não metabolizado.

AF: ácido fólico; THF: tetraidrofolato; DHF: diidrofolato; SAM: s-adenosilmetionina; SAH: s-adenosilhomocisteína; RFC: transportador de folato reduzido; FR: receptor de folato humano; B6: vitamina B6; B12: vitamina B<sub>12</sub>; MTHFR: metilenotetraidrofolato redutase; DHFR: diidrofolato redutase; MTHFD: metilenotetraidrofolato desidrogenase; CBS: cistationina β-sintase; MS: metionina sintase; MTs: metiltransferases; SHMT: serina metiltransferase; TS: timidilato sintetase; GART: glicinamida ribonucleotídeo transformilase; AICARFT: 5-amino-imidazol-4-carboxamida ribonucleotídeo transformilase; dUMP, deoxiuridina monofosfato; dTMP, deoxitimidina monofosfato; X: uma variedade de substratos para metilação. Fonte: Paniz, 2015.

As concentrações de folato sérico superiores a 45 nmol/L são consideradas altas (Smith *et al.*, 2008; Dary, 2009). Estudos realizados na população dos EUA, demonstraram que nos anos 1999 e 2000, 23% da população em geral, 43% de crianças com menos de 5 anos e 38% dos idosos estavam com concentrações superiores a 45 nmol/L de folato sérico (Pfeiffer *et al.*, 2004).

No Brasil, uma revisão utilizando estudos conduzidos antes e após fortificação das farinhas com AF, mostrou que as concentrações médias de folato sérico dobraram em relação às concentrações encontradas em estudos

anteriores à fortificação das farinhas de trigo e milho com AF (Britto *et al.*, 2014).

Entre as questões que ainda precisam ser esclarecidas está se o aumento da captação de AF em vez de 5-metil-THF durante a divisão celular pode reduzir o fornecimento de metionina, e se a ingestão de doses relativamente altas de AF pode, a longo prazo, modificar a expressão gênica das enzimas folato-dependentes, influenciando suas vias metabólicas (Smith *et al.*, 2008).

Dados obtidos por nosso grupo de pesquisa sugerem que altas concentrações de AF influenciam a absorção de ferro heme (Bertinato, 2018). Tanto o AF como o ferro heme são transportados pelo PCFT/HCP1. Este transportador possui maior afinidade pelo folato quando comparado ao ferro heme, diminuindo assim a absorção deste último (Inoue *et al.*, 2008; Laftah *et al.*, 2009).

Altas concentrações de AF circulante podem ainda, potencializar os efeitos de uma deficiência de vitamina B12 levando ao agravamento dos danos neurológicos associados com uma prolongada deficiência da mesma (Morris *et al.*, 2010). Além disso, considerando apenas os indivíduos com concentrações de vitamina B12  $<148$  pmol/L ou MMA  $\geq 210$  nmol/L (indicadores de deficiência de vitamina B12), a presença de UMFA foi relacionada a menores pontuações em testes cognitivos, bem como a um menor volume corpuscular médio (Morris *et al.*, 2010; Selhub and Paul, 2011).

## 1.5 ATIVAÇÃO DE LINFÓCITOS E A RESPOSTA IMUNE

Classicamente a resposta imune é dividida entre resposta inata e adquirida. Enquanto a imunidade inata é a resposta imediata e não específica, a adquirida é mais lenta e específica. As células do sistema imunológico inato são imediatamente recrutadas para combater e matar uma ampla gama de patógenos, entretanto acredita-se que estas células não adquiram memória imunológica para a defesa do hospedeiro em caso de reencontro com o

organismo invasor. Em contraste a resposta imune adaptativa, como a produção de anticorpos e/ou geração de linfócito T específico conferem especificidade e proteção, muitas vezes ao longo da vida, e em um reencontro com o mesmo patógeno leva a uma rápida expansão clonal das células de memória (linfócitos T e/ou linfócitos B). (Quintin *et al.*, 2014; Farber *et al.*, 2016)

Os linfócitos são as principais células mediadoras do sistema imune. Embora morfológicamente sejam semelhantes, os linfócitos apresentam grande heterogeneidade fenotípica, funcional. No sistema imune, quando uma célula T é ativada pela interação de seu receptor específico com o peptídeo antigênico ligado à molécula do complexo principal de histocompatibilidade (MHC), seja ela MHC classe I ou MHC classe II, pode-se observar proliferação celular e sua diferenciação em célula efetora. As células T efetoras são fundamentais para uma resposta imunológica contra patógenos intracelulares como os vírus, bactérias intracelulares, fungos, parasitas intracelulares e neoplasias (Li *et al.*, 2013).

Para exercer a sua função, os linfócitos T apresentam diversas subpopulações com funções diversas. Os linfócitos T CD4 apresentam funções auxiliaadoras, produzindo citocinas que modulam a função das células T CD8 citotóxicas ou monócitos macrófagos que efetuam a lise das células-alvo infectadas, e a ativação de células B na produção de diferentes classes de anticorpos por meio da interação CD154/CD40 (Courtemanche *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2013)

Os linfócitos T CD8 atuam de forma mais direta na célula alvo, sendo responsáveis por suprimir infecções por microrganismos intracelulares. A interação do linfócito T CD4 com o MHC classe II reduz bastante o número de peptídeos antigênicos necessários para a ativação das células T e aumenta substancialmente a produção de citocinas pelas células T auxiliares (Holler and Kranz, 2003).

Já os linfócitos B desempenham um papel central na resposta humoral. São células que iniciam o seu desenvolvimento na medula óssea e a maturação continua nos órgãos linfoides secundários, local no qual os linfócitos B virgens entram em contato com antígeno específico e são convertidos em plasmócitos secretores de anticorpos.



As células B incluem células B1 e B2. As células B1 secretam espontaneamente IgM (imunoglobulina M) natural e residem principalmente em cavidades pleurais e peritoneais. As células B2, por outro lado, medeiam a maioria da resposta de anticorpos dependente de células T. Além de secretar anticorpos, as células B expressam classe II do MHC e servem como células apresentadoras de antígenos (APCs) para as células T CD4<sup>+</sup> (Katikaneni and Jin, 2019). Ao que se sabe, a ativação de linfócitos T e B em resposta a concentrações elevadas de AF ainda não foi investigada.

As células NK, por outro lado, atuam nos mecanismos da resposta imune não específica e podem destruir uma variedade de células normais ou infectadas por vírus sem sensibilização prévia. Além disso, elas podem destruir células tumorais, evitando o crescimento e disseminação de tumores, participando da vigiância contra células tumorais (Troen *et al.*, 2006; Levy *et al.*, 2011)

As células NK são consideradas a primeira linha de defesa do sistema imune contra carcinogênese. Quando as células NK detectam células infectadas por vírus ou tumorais, elas destroem estas células por indução da apoptose e sinalizam outras células com liberação de citocinas (Romagné and Vivier, 2011). O sistema de detecção usado pelas células NK inclui uma variedade de receptores de ativação e inibição na superfície celular, que regula a atividade das mesmas. Assim, a interação com receptores das células vizinhas inibe ou ativa estas células para matar seu alvo (Vivier *et al.*, 2008).

Um estudo demonstrou que a capacidade citotóxica das células NK, de mulheres pós menopausa, com maiores concentrações plasmáticas de UMFA estava diminuída em relação as mulheres que possuíam concentrações menores de UMFA. Este estudo demonstrou ainda que, altas concentrações plasmáticas de UFMA diminuiu a capacidade citotóxica das células NK, independente as concentrações de folato total (Troen *et al.*, 2006). A redução na capacidade citotóxica das células NK pode aumentar o risco ou gravidade de infecções e tem sido associada com aumento futuro da incidência de câncer (Imai *et al.*, 2000).

A importância da associação entre o marcador CD16 (próprio da linhagem das células NK) e CD38 para a atividade citotóxica das células NK foi

descrita por Deaglio e colaboradores (Deaglio *et al.*, 2002). O aumento da expressão de CD38 em células NK foi associado a menor resposta a antirretrovirais e a progressão da doença em pacientes infectados pelo HIV (Kuri-Cervantes *et al.*, 2014; Luo *et al.*, 2017). Pacientes com hepatite B crônica sem tratamento também apresentaram maior expressão de CD38 em células NK quando comparado a indivíduos controle; além disso, com o tratamento e consequente redução da viremia, a expressão de CD38 também diminuiu (Boni *et al.*, 2015). Estudos demonstram que a proteína CD38 é um marcador de superfície de membrana envolvido na sinalização de eventos que incluem a mobilização de cálcio, fosforilação de tirosina, ativação de fatores nucleares e secreção de citocinas (Deaglio *et al.*, 2000).

Os HLAs são classificados como os principais complexos de histocompatibilidade (MHCs) por causa de seu importante papel em permitir que o sistema imunológico reconheça antígenos autoimune e/ou aloimune. O HLA-DR é um isotipo de MHC II (complexo de histocompatibilidade humana de classe II) frequentemente utilizado como marcador de ativação de células T, juntamente com outras moléculas, como CD69 e CD25, embora o seu papel nas células T, não tenha sido completamente elucidado a expressão constitutiva é limitada às APCs (células apresentadoras de antígenos) e estas células utilizam HLA-DR para apresentar antígenos às células T CD4 (Della Chiesa *et al.*, 2019).

Estudos recentes vincularam a ativação de células T à persistência do HIV, mostrando que o HIV-DNA persiste nas células T CD4 com memória ativada por HLA-DR até 1 ano após o início da terapia (Lee *et al.*, 2019). Apesar de vários estudos demonstrarem associação de moléculas da classe II com várias doenças autoimunes, os mecanismos para explicar essas associações não estão esclarecidos (Taneja *et al.*, 2010).

A molécula CD69 é expressa na maior parte dos leucócitos, o que permite seu amplo uso como marcador da ativação de linfócitos, principalmente das células NK. Embora o papel exato de CD69 no sistema imune ainda necessite de maiores investigações, as atuais evidências demonstram que CD69 pode determinar padrões de liberação de citocinas, bem como o *homing* e migração dos linfócitos (Cibrián and Sánchez-Madrid, 2017).

A ativação linfocitária que ocorre durante a resposta imunológica é desencadeada pelo reconhecimento de antígenos, que variam desde a molécula de microrganismo e alérgenos, ou estruturas próprias em alguma doença linfoproliferativa ou auto-imune. No **Quadro 2** estão relacionados os marcadores de superfície de ativação de linfócitos CD38, CD69 e HLA-DR com os eventos clínicos relevantes.

**Quadro 2.** Marcadores de superfície relacionados à ativação de linfócitos, funções e associação com eventos clínicos

Biomarcador	Função	Associação com eventos clínicos
CD38	Adesão celular e transdução de sinal	CD3+/CD38+ foi associado com o aumento do risco de rejeição a transplantes de fígado (ref). A expressão de CD38 em células CD8+ aumentou com a ativação de citomegalovírus em infecções e um decréscimo gradual depois do bem-sucedido tratamento com ganciclovir (ref).
HLA-DR	Ligação das células T com o receptor- Apresentação do peptídeo antigênico para o sistema imune.	Houve um aumento de CD3+/HLA-DR+ em pacientes com rejeição de grau 2 a transplante cardíaco. Aumento da expressão de HLA-DR em células CD4+ associadas com rejeição a transplante de fígado.
CD69	Ativação e proliferação de linfócitos - Transmissão de sinal em linfócitos, células NK e plaquetas	Expressão de CD69 em células T de memória foi associado com rejeição a transplantes cardíacos (ref). Estimulação com células doadoras e os peptídeos sintéticos correspondiam a antígenos de HLA-DR dadores incompatíveis num ensaio de diluição limitante.

HLA: human leukocyte antigen. Adaptado de Wieland e Shipkova, 2016.

## 1.6 CITOCINAS INFLAMATÓRIAS

O sistema imune dos seres humanos inclui um conjunto complexo de células e de moléculas que interagem para fornecer a proteção contra bactérias, vírus e parasitas. Uma das primeiras respostas do sistema imune inato a infecções e danos teciduais é a secreção de citocinas por células, que é

de extrema importância nas respostas inflamatórias agudas. A inflamação desempenha um papel essencial no controle de patógenos e na modelagem das respostas imunes adaptativas decorrentes (Janeway, 2001; Cronkite and Strutt, 2018).

As células NK são importantes produtoras de algumas citocinas tais como interferon- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) em várias condições fisiológicas e patológicas. Além disso, são responsáveis pela produção de muitas outras citocinas inflamatórias e imunossupressoras como o TNF- $\alpha$  e IL-10, respectivamente, além de fatores de crescimento (Vivier *et al.*, 2011).

O IFN- $\gamma$  é uma citocina pró-inflamatória potente que desempenha papéis importantes, entre os quais, o aumento da expressão de receptores *Toll-like* (TLR), a indução da secreção de quimiocinas, a ativação de macrófagos e o aumento da fagocitose (Raphael *et al.*, 2015). No entanto, várias hipóteses foram propostas para explicar as propriedades anti-inflamatórias do IFN- $\gamma$ , incluindo a regulação negativa do tráfego de linfócitos nos linfonodos de drenagem e o controle da expansão clonal de células T na via de indução de apoptose (Refaeli *et al.*, 2002). O IFN- $\gamma$  é importante para a indução de indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO), que por sua vez exerce efeitos anti-inflamatórios em linfonodos e tecidos. O IFN- $\gamma$  também pode suprimir a diferenciação de células T para outros subconjuntos Th, por exemplo, para células Th17 (Raphael *et al.*, 2015).

O TNF- $\alpha$  foi originalmente descrito como um fator circulante que pode causar necrose de tumores e desde então tem sido identificado como um dos principais reguladores da resposta inflamatória aguda a bactérias e outros micro-organismos infecciosos (Sinagra *et al.*, 2013).

A interleucina-10 (IL-10) é uma citocina anti-inflamatória que desempenha um papel crucial na prevenção da inflamação e de doenças autoimunes (Saraiva e O'garra, 2010; Raphael *et al.*, 2015) sendo expressa por células do sistema imune inato e adaptativo, incluindo células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, macrófagos, mastócitos, células NK, eosinófilos e neutrófilos (Asseman *et al.*, 1999).

A IL-10 é um potente fator de crescimento e diferenciação para linfócitos B humanos ativados (Kühn *et al.*, 1993). As células T reguladoras tipo 1 (Tr1) que induzidas pela ativação crônica do CD4<sup>+</sup> são uma fonte dominante para esta citocina (Zeng *et al.*, 2015). Esta citocina é importante para a geração e manutenção de células Tr1 através de um processo autócrino. Os efeitos imunossupressores da IL-10 são amplamente mediados através do seu impacto nas células apresentadoras de antígenos (APCs), onde se demonstrou que ela regula negativamente a expressão de MHC-II. Além disso, ela reduz a liberação de citocinas pró-inflamatórias pelos macrófagos e mastócitos (Asseman *et al.*, 1999; Raphael *et al.*, 2015). Já *in vivo* foi demonstrado que a IL-10 induziu aumento da atividade citolítica das células NK (Lauw *et al.*, 2000).

A interleucina-6 (IL-6) é uma citocina pró-inflamatória multifuncional, com diversos efeitos, produzida por uma variedade de células, entre as quais linfócitos T e B, fibroblastos, monócitos e células endoteliais (Ataie-Kachoei *et al.*, 2013). A sinalização de IL-6 desempenha um papel vital no controle da diferenciação e ativação de linfócitos T por induzir diferentes vias. Em particular, a IL-6 controla o equilíbrio entre células Th17 e células T reguladoras (Treg). Foi descrito que um desequilíbrio entre as células Treg e Th17 desempenha um papel patológico em várias doenças imunomediadas (Zhang *et al.*, 2014). Numerosos estudos pré-clínicos e clínicos demonstram o papel da IL-6 na inflamação, autoimunidade e câncer. A produção e sinalização desreguladas de IL-6 está associada à tolerância imunológica. Por isso, os métodos de inibição da produção, receptores e vias de sinalização de IL-6 são utilizados para desenvolver novas terapias que induzam a tolerância imunológica (Zhang *et al.*, 2014). O tocilizumabe, um anticorpo monoclonal anti-receptor da IL-6, é eficaz no tratamento de várias condições auto-imunes e inflamatórias (Yao *et al.*, 2014).

A interleucina-8 (IL-8) é uma citocina produzida por algumas células, tais como: células endoteliais, fibroblastos, monócitos, macrófagos, e linfócitos T (Nonaka *et al.*, 1996). É também conhecida como “citocina quimiotática”, por ser um potente mediador do recrutamento de células e da neovascularização em doenças inflamatórias e neoplásicas (Leonard *et al.*, 1990). Essa citocina recruta principalmente neutrófilos para locais de infecção, estimula sua

degranulação e a fagocitose em células efetoras. A migração dos leucócitos se dá através de um gradiente de quimiocinas cuja concentração vai aumentando em direção ao foco inflamatório (Ohkubo *et al.*, 1998; Kleinjan *et al.*, 1999). Tem sido observado que a IL-8 está aumentada quando ocorre processo inflamatório endotelial associado com o aumento de tHcy, mostrando uma associação entre esta citocina e o metabolismo do folato (Laanpere *et al.*, 2010).

**Tabela 2.** Citocinas da imunidade inata, principal fonte celular e principais alvos celulares e efeitos biológicos

Citocina	Fonte Celular	Principais Alvos Celulares e Efeitos Biológicos
TNF- $\alpha$	Macrófagos Linfócitos T	Células Endoteliais: ativação (inflamação e processo de coagulação) Neutrófilos: ativação Hipotálamo: Febre Fígado: Síntese de proteínas de fase aguda Músculo, tecido adiposo: catabolismo (caquexia) Muitos tipos celulares: apoptose
IFN- $\gamma$	Células NK Linfócitos T	Macrófagos: ativação Produção de IgG
IL-6	Macrófagos Células endoteliais Linfócitos T	Fígado: Síntese de proteínas na fase aguda Linfócitos B: Proliferação de células produtoras de anticorpos
IL-8	Macrófagos Linfócitos T Células endoteliais	Recruta células efetoras Neutrófilos: Estimula degranulação e a fagocitose em células efetoras
IL-10	Macrófagos Linfócitos T (Principalmente Linfócitos Tregs)	Macrófagos, células dendríticas: inibição da produção de IL-2 e da expressão de moléculas co-estimuladoras e moléculas de MHC de classe II

TNF-  $\alpha$ : Fator de Necrose Tumoral alfa; IFN- $\gamma$ : Interferon gama; IL : Interleucina ; (Donaldson, 2007).

## 1.7 POSSÍVEIS EFEITOS DO ÁCIDO FÓLICO

Existe grande discussão na literatura científica sobre os possíveis efeitos do excesso de AF no organismo, como o aparecimento de AF não metabolizado na circulação (UMFA), alterações no metabolismo dos folatos naturais (Ashokkumar *et al.*, 2007; Smith *et al.*, 2008), exacerbação da deficiência de vitamina B12 (Selhub and Paul, 2011) e interferência sobre o processo inflamatório (Troen *et al.*, 2006).

O AF e a vitamina B12 desempenham um papel na função imunológica devido ao seu papel crucial na síntese de DNA e proteínas, o que sugere que todos os mecanismos que envolvam proliferação celular possam ser alterados por um desequilíbrio dessas vitaminas no organismo. A imunidade mediada por células é especialmente afetada pela deficiência de folato: a resposta dos linfócitos T a certos mitógenos diminui em humanos e animais com deficiência de folato. Os efeitos do ácido fólico a deficiência na imunidade humoral foi investigada mais minuciosamente em animais do que em humanos, e as respostas de anticorpos a vários antígenos foram mostradas para diminuir (Dhur *et al.*, 1991)

Mais especificamente, a deficiência de folato nos linfócitos T humanos ativados por fito-hemaglutinina cultivada (PHA) é capaz de reduzir a proliferação de linfócitos T, induzir apoptose e aumentar a razão CD4/CD8 devido a uma redução acentuada da proliferação de células CD8, o que pode levar a uma menor resistência a infecções. Dessa forma, a suplementação com quantidades adequadas de AF pode ser benéfico para a função imunológica (Courtemanche *et al.*, 2004; Field *et al.*, 2006).

Acredita-se que as necessidades de folato na dieta possam ser de extrema importância durante o processo de envelhecimento, como proteção da função imunológica, uma vez que a imunidade é deteriorada com a idade. A diminuição da memória das células T e a exaustão da população virgem de células T são comumente observadas em idosos.

Cerca de 38% dos idosos nos EUA têm ácido fólico sérico não metabolizado que persiste mesmo após o jejum ( $4.4 \pm 0.6$  nmol/L) (Bailey, 2010). Estudos mostram associação entre o UMFA no plasma com a diminuição da capacidade citotóxica das células NK. Assim, a fortificação ou suplementação com FA pode suprimir a função NK, que é crítica para a função imune normal

Assim, a fortificação ou suplementação com FA pode suprimir a função NK, que é crítica para a função imune normal. Tamura *et al.* sugeriram que a vitamina B<sub>12</sub> pode desempenhar um papel importante na imunidade celular, afetando principalmente as células CD8<sup>+</sup> e o sistema celular NK, o que sugere efeitos nas células citotóxicas.

Embora existam várias formas de folato, com participações peculiares em rotas metabólicas diversas, a determinação sérica de tais formas não é feita rotineiramente no Brasil. Isso ocorre principalmente devido ao elevado custo destas análises, uma vez que, implicam no uso de metodologia mais sofisticada. Desse modo, os possíveis efeitos do aumento ou da redução de cada uma das formas de folato no metabolismo, e consequentemente, na saúde humana são ainda pouco conhecidos. Gera mais preocupação a presença de elevadas concentrações plasmáticas circulantes de UMFA, uma vez que se trata de uma molécula sintética, que ao não sofrer processo de redução, pode permanecer circulante na forma não utilizável pelo organismo, com consequências ainda pouco conhecidas.

Estudo de nosso grupo, com pacientes portadores de esferocitose hereditária, os quais eram tratados com doses diárias de 5mg de AF por longos períodos, mostrou que estes indivíduos apresentaram maiores concentrações séricas de folato e UMFA e maior expressão de RNAm do gene da DHFR comparados com portadores da mesma doença não submetidos a este tratamento, provavelmente em decorrência da saturação da enzima DHFR (Paniz *et al.*, 2019).

Em outro estudo de nosso grupo, foi demonstrado que o consumo de concentrações elevadas de AF (5mg/dia) por indivíduos saudáveis durante 90 dias, foi associado com concentrações elevadas de folato sérico e de UMFA, e maior expressão de RNAm de DHFR, IL-8 e TNF- $\alpha$ . Foi observado também uma significativa redução no número e na capacidade citotóxica das células NK após 45 dias de tais doses diárias de AF (Paniz *et al.*, 2017). Desta forma, concentrações elevadas de folato e de UMFA parecem estar implicados com alterações ou modificações da imunidade.

Diante disso, o presente estudo tem como objetivo verificar se existe associação entre o consumo diário de 5mg de AF e a ativação e proliferação de linfócitos (T, B, NK), bem como, analisar se existe associação com a expressão de RNAm de citocinas e suas concentrações plasmáticas em indivíduos saudáveis.



## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a associação entre o consumo diário de 5mg de AF com a ativação e proliferação de linfócitos (T, B, NK) e investigar possíveis consequências no processo inflamatório em indivíduos saudáveis.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Verificar se existe associação entre o uso de 5 mg/dia de AF, por um período de 45 e 90 dias e as concentrações séricas de folato e vitamina B12 em indivíduos saudáveis.
- ✓ Avaliar as concentrações das folato e vitamina B12 e sua relação com a expressão de RNAm de citocinas em leucócitos mononucleares de indivíduos saudáveis submetidos à intervenção com 5 mg/dia de AF;
- ✓ Avaliar a proporção e ativação de linfócitos (T, B e NK) nos indivíduos submetidos à intervenção com 5 mg/dia de AF;
- ✓ Determinar se existe associação entre a concentração sérica das citocinas (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 e IL-10) e as concentrações de UMFA e de folato (sérico e eritrocitário) nos indivíduos submetidos à intervenção com 5 mg/dia de AF.

### **3 CASUÍSTICA E MÉTODOS**

#### **3.1 CASUÍSTICA**

Foram incluídos 37 indivíduos saudáveis, sendo 23 mulheres e 14 homens, com idades entre 18 e 42 anos, selecionados entre alunos e funcionários na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP. Os participantes foram submetidos à intervenção com 1 comprimido de 5 mg de AF por dia pelo período de 90 dias.

Os critérios de exclusão incluíram gestantes, etilistas crônicos, indivíduos que tenham feito uso de AF e polivitamínicos ou realizado transfusões sanguíneas nos 6 meses anteriores ao início do estudo, bem como portadores de alergias, doenças inflamatórias, e outras doenças crônicas (diabetes, hipertensão, hipercolesterolemia, doenças da tireoide, etc.) e os que estavam fazendo uso de medicações imunossupressoras.

Do total de 37 indivíduos incluídos, 3 foram excluídos: 2 porque não concluíram a etapa de 45 e 90 dias de uso de AF (1 mulher e 2 homens); enquanto 1 indivíduo não completou a etapa de 90 dias de uso de AF. Dessa forma, no presente estudo, serão apresentados os resultados obtidos de 34 indivíduos concluíram o uso regular diário de 5 mg de AF por 90 dias.

##### **3.1.1 Aspectos éticos**

Todos os indivíduos participantes deste estudo foram informados sobre os objetivos do projeto e consultados sobre a vontade de participar da pesquisa. Aqueles que concordaram em participar assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo sob parecer número 1.862.205 em “12/12/2016” (CAAE: 60501516.7.0000.0067).

## 3.2 MÉTODOS

### 3.2.1 Amostras

Foram coletadas amostras de sangue periférico dos participantes em jejum de 8 horas, antes do início da intervenção com AF e após 45 e 90 dias de uso dessa vitamina. Foi tomado o cuidado de realizar a coleta das amostras de sangue após, no mínimo, 15 horas do último uso de AF. As amostras foram coletadas em tubos à vácuo (sistema Vacutainer®) sem anticoagulante para a obtenção de soro, contendo EDTA para obtenção de plasma e realização de hemograma, e contendo heparina para a obtenção de células mononucleares.

### 3.2.2 Determinação de hemograma, contagem de reticulócitos, proteína C reativa ultrassensível (PCRus) e desidrogenase láctica (DHL)

O hemograma foi realizado por meio do contador eletrônico Pentra 120 (HORIBA, Montpellier, França), imediatamente após a coleta de sangue. A contagem de reticulócitos foi realizada manualmente com o corante azul de cresil brilhante. As determinações de PCRus foram realizadas por imunoturbidimetria ultrassensível utilizando o kit Roche-CRPL 3 e o equipamento COBAS 8.000 (Roche Diagnostics, Indianapolis, USA). A atividade sérica da LDH foi determinada por ensaio enzimático, utilizando o equipamento Vitros 250® (Ortho Clinical Diagnostics, Rochester, USA).

### 3.2.3 Determinação das concentrações de folato sérico e eritrocitário e de vitamina B12

As concentrações de folato sérico e eritrocitário foram determinadas por método microbiológico, utilizando-se cepas de *Lactobacillus casei* conforme descrito anteriormente (O'broin e Kelleher, 1992).

Para a determinação do folato eritrocitário, no dia da coleta, foi preparado um hemolisado das amostras, adicionando-se 100µL de sangue coletado com EDTA em 1mL de solução de ácido ascórbico 1%. Estas amostras foram armazenadas durante 90 minutos à temperatura ambiente e protegidas da luz, em seguida, armazenadas a -80°C até o momento das análises. A partir deste hemolisado, foi realizada a determinação de folato pelo método microbiológico.

$$\text{Folato eritrocitário} = \frac{(\text{Folato no hemolisado} \times 11) - \left( \left( 1 - \left( \frac{\text{Ht}}{100} \right) \right) \times \text{folato sérico} \right)}{\left( \frac{\text{Ht}}{100} \right)}$$

Ht: hematócrito em %; 11: fator de diluição; Folato eritrocitário, sérico e no hemolisado em nmol/L

As determinações de folato e vitamina B12 foram realizadas utilizando-se cepas de *Lactobacillus casei* (O'broin and Kelleher, 1992) e de *Lactobacillus leishmannii* (Kelleher *et al.*, 1987; Kelleher and Broin, 1991), respectivamente. Para dosagem do folato sérico e vitamina B12 sérica, foram utilizadas amostras de soro dos participantes armazenadas a -80 °C.

### **3.2.4 Dosagem de ácido fólico não metabolizado (UMFA) e formas de folato**

A determinação sérica de UMFA e outras formas de folato, dos 34 participantes iniciais, foi realizada por LC-MS/MS. Foi avaliado um painel de analitos composto por: UMFA, 5-metil-THF, P-acetoaminobenzoglutamato e o produto de degradação do 5-metil-THF (Hidróxi-Metil-THF), pela equipe do Prof. Dr. Per Magne Ueland no Laboratório Belvital (Bergen, Noruega) (Hannisdal *et al.*, 2009).

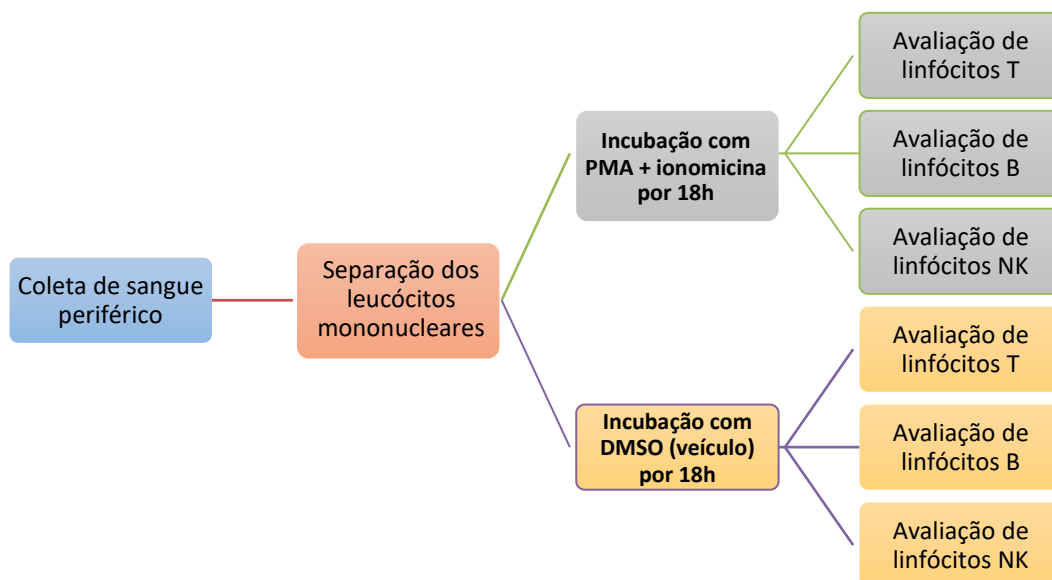
### 3.2.5 Isolamento de leucócitos mononucleares

Os leucócitos mononucleares provenientes do sangue periférico (CMSP) colhido com heparina foram separados por gradiente descontínuo de Ficoll-Hypaque de densidade específica de 1,070 g/mL (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA), à temperatura ambiente (Böyum, 1968).

Foram separadas  $5 \times 10^6$  células para a posterior extração de RNA, e o restante foi usado para o ensaio de ativação de linfócitos B, T, NK e de populações de linfócitos por marcação CD (*cluster of differentiation*).

### 3.2.6 Quantificação e ativação de linfócitos B, T, NK em indivíduos saudáveis antes e após o uso de 5mg/dia de AF

Para esta análise foi realizado um teste de detecção de proporção e ativação por análise de marcação de anticorpos por citometria de fluxo. O esquema da parte experimental dessa etapa está resumido na **Figura 7**.



**Figura 7.** Esquema do desenho experimental utilizado na quantificação e ativação de linfócitos B, T e NK em indivíduos saudáveis antes e após o uso de 5mg/dia de AF.

PMA: 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato; DMSO: dimetilsulfóxido; NK: células *Natural Killer*; Treg: linfócitos T regulatórios.

Para o estudo de ativação dos linfócitos, foram utilizados os reagentes 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (PMA) e ionomicina, que possuíam DMSO como veículo. Ensaios com PMA + ionomicina são frequentemente utilizados para estudar a ativação de linfócitos. O PMA estimula a transdução de sinal via proteína quinase C (Conquer *et al.*, 1992; Ward and Moffat, 1992), e a ionomicina aumenta a concentração intracelular de cálcio (Ozaki *et al.*, 1990; Wang *et al.*, 2000; Yoshida *et al.*, 2010).

As células de cada paciente foram colocadas em meio de cultura RPMI 1680 com concentração de 20 ng/mL de ácido fólico. Em seguida, os mononucleares foram divididos em duas alíquotas de  $1 \times 10^6$  células/mL em placas de 6 poços, sendo que uma delas foi incubada com 10 ng/mL de PMA (total de 10 µL adicionados) e 1 µg/mL de ionomicina (total de 3,33 µL adicionados), e a outra foi incubada com 13,33 µL de DMSO. As placas foram incubadas em estufa a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> durante 18 horas. Após a incubação, foi adicionado o anticorpo, para detecção de cada tipo celular. Os anticorpos utilizados estão descritos no **Quadro 3**. Para cada painel, os anticorpos foram selecionados de acordo com as características imunofenotípicas de cada linhagem, além de serem utilizados anticorpos que avaliassem a ativação das células T, B e NK (**Quadro 4**).

**Quadro 3.** Características dos anticorpos utilizados nos painéis segundo as fluorescências, fornecedores e referência

Anticorpo	Fluorescência	Marca	Referência
CD3	APC	BD*	555342
CD4	PerCP	BD*	347324
CD8	PE	BD*	555367
CD8	PerCP	BD*	347314
CD56	PE	BD*	555516
CD16	PE	BD*	555407
CD19	PerCP	BD*	347544
CD69	PE-Cy7	BD*	557754
CD38	BB515	BD*	564498
HLA-DR	APC	BD*	559866

\*BD Biosciences, San Jose/CA, EUA.

**Quadro 4.** Marcadores celulares de ativação e de viabilidade para cada tipo de linfócitos

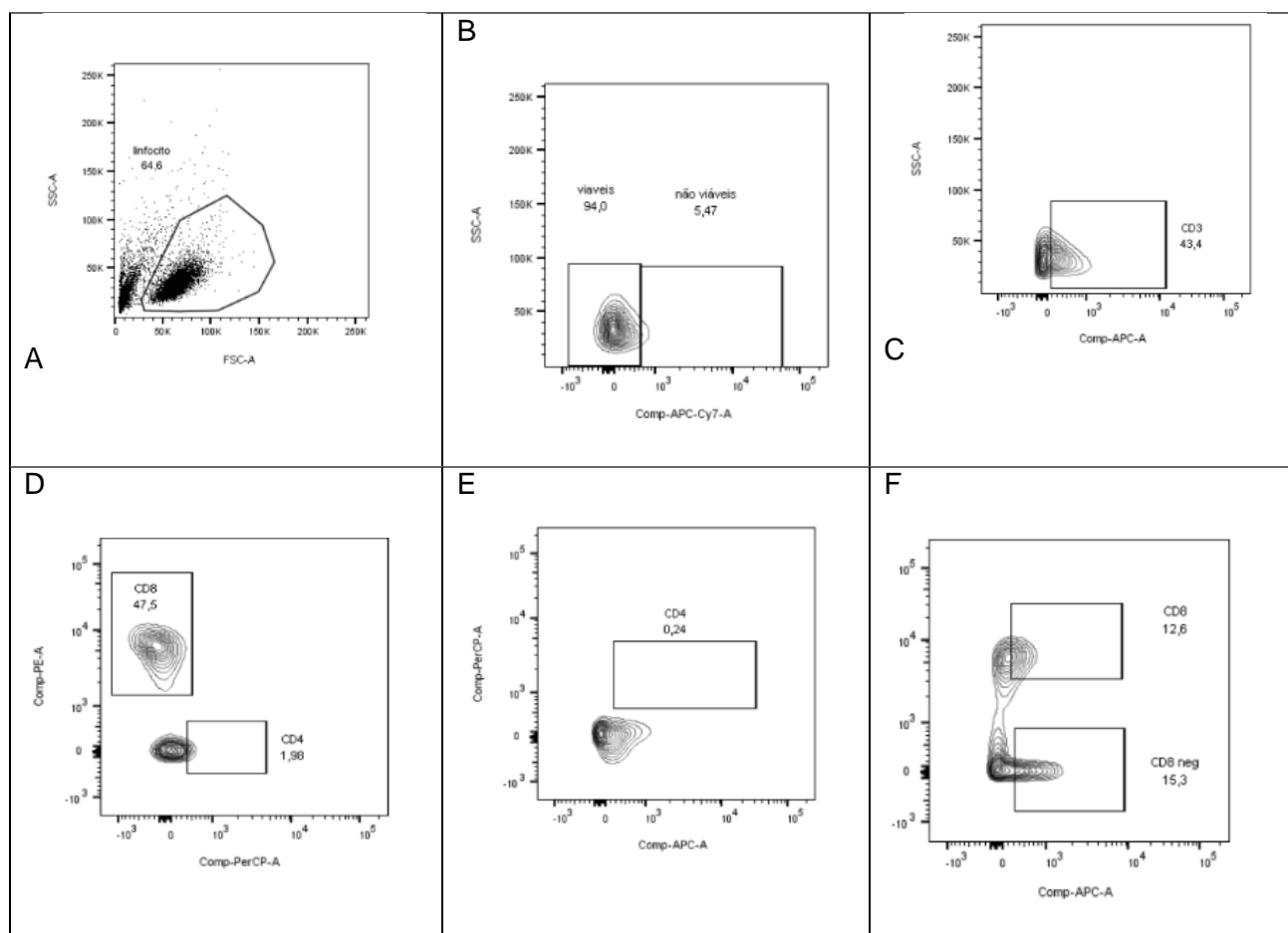
Painel	Tipo de linfócitos	Marcadores fenotípicos de linhagem	Ativação	Viabilidade celular
1	T CD4 <sup>+</sup>	CD3 <sup>+</sup> (APC), CD4 <sup>+</sup> (PerCP) e CD8 <sup>-</sup> (PE)	CD69 <sup>+</sup> (PE-Cy7) e CD38 <sup>+</sup> (BB515)	FVS780 <sup>-</sup> (APC-Cy7)
	T CD8 <sup>+</sup>	CD3 <sup>+</sup> (APC) e CD8 <sup>+</sup> (PE)	CD69 <sup>+</sup> (PE-Cy7) e CD38 <sup>+</sup> (BB515)	FVS780 <sup>-</sup> (APC-Cy7)
2	B	CD19 <sup>+</sup> (PerCP)	CD69 <sup>+</sup> (PE-Cy7), CD38 <sup>+</sup> (BB515) e HLA-DR <sup>+</sup> (APC)	FVS780 <sup>-</sup> (APC-Cy7)
3	NK	CD56 <sup>+</sup> (PE) e CD16 <sup>+</sup> (PE)	CD69 <sup>+</sup> (PE-Cy7), CD38 <sup>+</sup> (BB515) e HLA-DR <sup>+</sup> (APC)	FVS780 <sup>-</sup> (APC-Cy7)

Em todos os painéis, foi utilizado o marcador FVS780 (*Fixable Viability Stain 780*) para discriminação das células mortas. Este marcador foi importante para a seleção de apenas células viáveis, excluindo as não viáveis da análise, o que poderia interferir em nosso resultado final, mascarando os resultados da ativação dos linfócitos. Uma vez que o tratamento com PMA + ionomicina leva a redução da expressão de CD4 pelos linfócitos CD4<sup>+</sup> (Wang *et al.*, 2013), prejudicando nossa análise, utilizou-se como estratégia a marcação com o anticorpo anti-CD8, de forma que as células CD8<sup>-</sup> foram consideradas CD4<sup>+</sup>.

Após marcação das células com os anticorpos, a leitura foi realizada no equipamento FACS Canto II (*BD Biosciences, San Jose, USA*). Para cada tubo de reação, foram analisados 50.000 eventos. Foram utilizados painéis contendo, no máximo, 6 marcadores, devido as características do citômetro disponível em nosso departamento, que tem a capacidade de ler até 6 canais de fluorescência.

Na **Figura 8** está descrita a sequência utilizada para a identificação dos linfócitos T ativados. Primeiramente, foram separados os linfócitos do *pool* de mononucleares, utilizando os parâmetros de tamanho (FSC) e complexidade (SSC) (A). Com a utilização do marcador FVS780, foram selecionadas apenas as células viáveis (B) e em seguida, foi realizada a seleção apenas dos linfócitos T positivos para CD3 (C). Em seguida, foram selecionados os linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> (D). No entanto, durante a padronização da

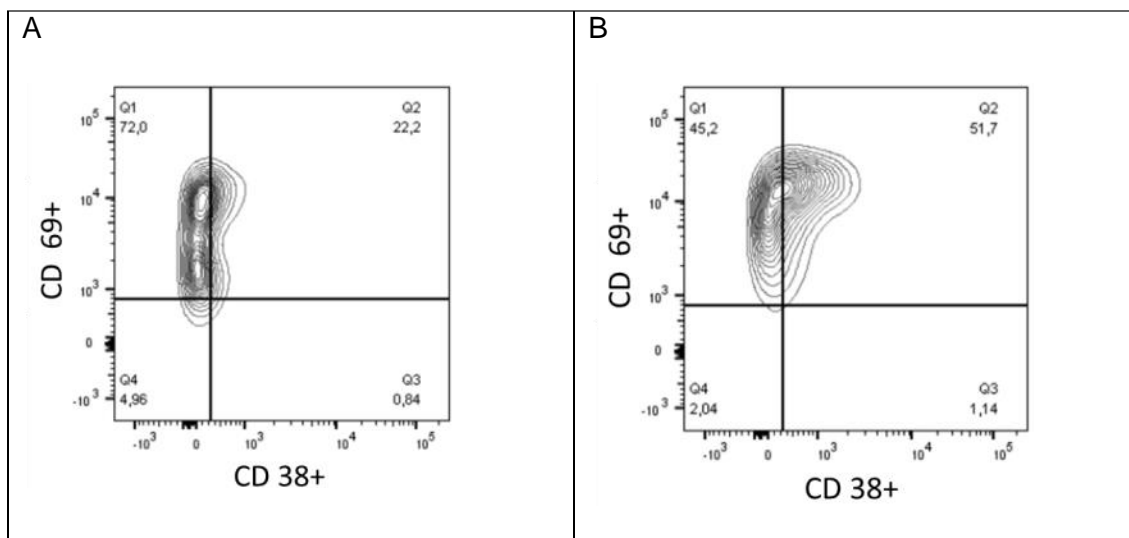
citometria de fluxo, observou-se que no tratamento com PMA e ionomomicina, as células perdiam a marcação positiva pra CD4, provavelmente devido a internalização deste marcador de superfície (E). Dessa forma, foi decidido que as células  $CD3^+/CD8^+$  e  $CD3^+/CD8^-$  seriam representativas das células  $CD4^+$  e  $CD8^+$  (F). A proporção de células  $CD4^+$  e  $CD8^+$  (%) foi obtida em função dos linfócitos totais obtidos pela análise do citômetro. A partir da seleção das linhagens de linfócitos T  $CD4^+$  e  $CD8^+$ , foram avaliados os marcadores de ativação  $CD38^+$  e  $CD69^+$ , conforme demonstrado na **Figura 9**. Para análise dos resultados, foi utilizado o número de eventos correspondente a cada marcação em cada experimento.



**Figura 8.** Estratégia utilizada para identificação por citometria de fluxo dos linfócitos T.

Após selecionado o *gate* em linfócitos (A), foram selecionadas as células negativas para FVS780 (viáveis) (B),  $CD3^+$  (C) e  $CD4^+$  e  $CD8^-$  como representantes dos linfócitos (D),  $CD4^+$  (E) e  $CD8^+$  e  $CD8^-$  (F).

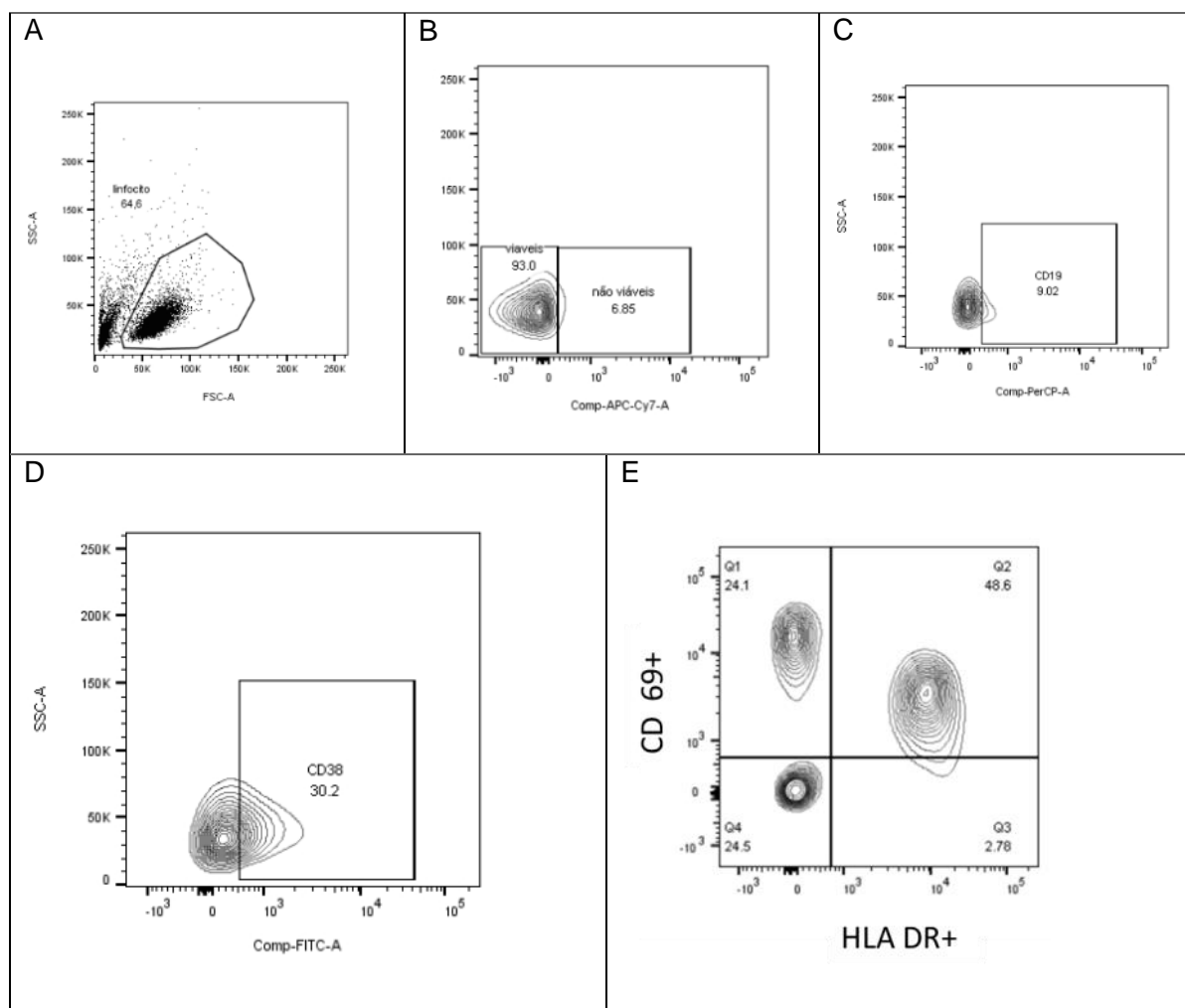




**Figura 9.** Estratégia utilizada para avaliação da ativação de linfócitos T. (A) linfócitos T CD8<sup>+</sup>; (B) linfócitos T CD4<sup>+</sup>.

Linfócitos T ativados CD8+/CD69+ e T CD8+/CD38+ (A); Linfócitos T ativados CD4+/CD69+ e CD4+/CD38+(B).

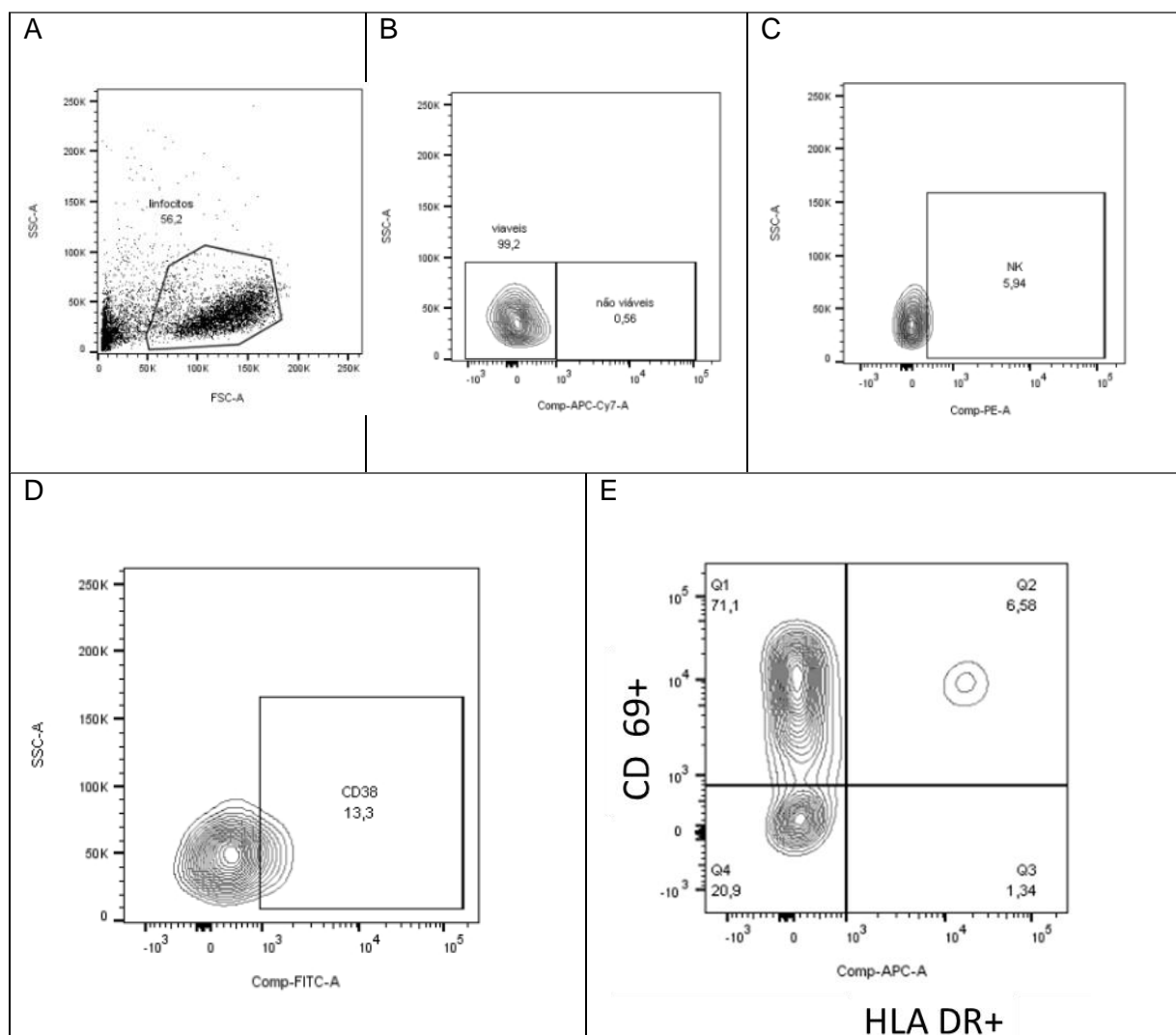
Para avaliar a ativação dos linfócitos B, adotamos a estratégia descrita na **Figura 10**. Inicialmente foram selecionadas células de tamanho e complexidade semelhantes aos linfócitos (A); em seguida foram separadas apenas as células viáveis (B), para em seguida, selecionar os linfócitos B com o anticorpo específico para linhagem B (CD19<sup>+</sup>) (C). E, por fim, para avaliarmos a ativação, verificamos as células que marcaram com os anticorpos CD38 (E) e CD69 e HLA-DR (F). A proporção de células B (%) foi obtida em função dos linfócitos totais obtidos pela análise do citômetro de fluxo. Para análise dos resultados, foi utilizado o número de eventos correspondente a cada marcação e cada experimento.



**Figura 10.** Estratégia utilizada para identificação e ativação por citometria de fluxo dos linfócitos B.

Após selecionado o *gate* em linfócitos (A), foram selecionadas as células negativas para FVS780 (viáveis) (B), CD19<sup>+</sup> como representantes dos linfócitos B (C), CD38 (D) e CD 69<sup>+</sup> e HLA DR<sup>+</sup> (D).

Para avaliar a ativação dos linfócitos NK, adotamos a estratégia descrita na **Figura 11**. Inicialmente, foram selecionadas células de tamanho e complexidade semelhantes aos linfócitos (A), em seguida foram separadas apenas as células viáveis (B), para em seguida selecionar os linfócitos NK (CD16/56<sup>+</sup>) (C). E, por fim, para avaliarmos a ativação, verificamos as células que marcaram com os anticorpos CD38 (D) e CD69 e HLA-DR (E). A proporção de células NK (%) foi obtida em função dos linfócitos totais obtidos por citometria de fluxo. Para análise dos resultados, foi utilizado o número de eventos correspondente a cada marcação e cada experimento.



**Figura 11.** Estratégia utilizada para identificação e ativação por citometria de fluxo dos linfócitos NK.

Após selecionado o *gate* em linfócitos (A), foram selecionadas as células negativas para FVS780 (viáveis) (B), CD16/56<sup>+</sup> como representantes dos linfócitos NK (C), CD16/56<sup>+</sup>/CD38 (D) e CD16/56<sup>+</sup>/CD 69<sup>+</sup> e CD16/56<sup>+</sup>/HLA DR<sup>+</sup> (D).

### 3.2.7 Determinação das concentrações séricas das citocinas inflamatórias

As concentrações séricas das citocinas inflamatórias (IL-6, IL-8, IL-10, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ) foram determinadas através de imunoensaio multiplex, utilizando os painéis de alta sensibilidade *T Cell Magnetic Bead Milliplex Map* (EMD Millipore Corporation, St. Charles, USA) e o equipamento Bio-Plex 200<sup>®</sup> (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA).

### 3.2.8 Determinação de expressão de RNAm

As células mononucleares foram homogeneizadas com 1 mL de Trizol<sup>®</sup> e armazenadas a -80° C até posterior extração do RNA. Após a extração uma alíquota foi utilizada para quantificação e avaliação da integridade e o conteúdo de RNA remanescente foi armazenado em -80°C para análises posteriores.

A concentração de RNA foi determinada por espectrofotometria a 260nm utilizando o espectrofotômetro Nanodrop ND-1000 (*Thermo Scientific, Wilmington, USA*), e a avaliação da integridade foi realizada por eletroforese em gel de agarose a 1% corado com GelRed<sup>™</sup>.

A determinação da expressão de RNAm dos genes do interferon- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , interleucina-8, interleucina-6, MTHFR e DHFR foi realizada em duplicata por *Real Time PCR*, no equipamento ABI 7500 (*Applied Biosystems, Foster City, USA*), utilizando os ensaios *TaqMan<sup>®</sup> Gene Expression Assays* (*Applied Biosystems, Foster City, USA*). Os ensaios empregados estão descritos no **Quadro 5**.

**Quadro 5.** Características dos ensaios *Taqman<sup>®</sup>* empregados para avaliação da expressão dos genes *DHFR*, *MTHFR*, *IFNG*, *TNFA*, *IL8* e *IL6*

Gene	Identidade do ensaio	Fragmento amplificado (pb)
<b><i>DHFR</i></b>	Hs00758822_s1	75
<b><i>MTHFR</i></b>	Hs00195560_m1	95
<b><i>IFNG</i></b>	Hs00989291_m1	73
<b><i>TNFA</i></b>	Hs01113624_g1	143
<b><i>IL8</i></b>	Hs01553824_g1	91
<b><i>IL6</i></b>	Hs00174131_m1	95

*DHFR*: diidrofolato redutase; *MTHFR*: metilenotetraidrofolato redutase; *IFN- $\gamma$* : interferon- $\gamma$ ; *TNF- $\alpha$* : fator de necrose tumoral- $\alpha$ ; *IL-8*: interleucina-8; pb, pares de bases

Os resultados foram analisados com o software *System 7500* versão 2.0.6 (*Applied Biosystems, Foster City, USA*), que gera curvas semi-logarítmicas dos sinais de amplificação. O equipamento gerou curvas semi-logarítmicas dos sinais de amplificação por monitoração contínua de fluorescência (Hirayama *et al.*, 2008). Os valores quantitativos da expressão

dos genes foram obtidos pelos valores do CT (*threshold cycle*) ou limiar da amplificação, que se caracteriza pelo início da amplificação do produto de PCR, de acordo com a seguinte fórmula:  $2^{-\Delta CT}$ , onde  $\Delta CT$  é igual ao CT do gene de interesse menos a média do CT dos genes de referência.

Como controle de qualidade, todas as reações foram realizadas em duplicata e para cada placa de reação foram analisados controles sem amostra (controle negativo) com a finalidade de avaliar possíveis contaminações dos reagentes com os produtos de PCR.

A análise da expressão gênica foi feita pelo método de quantificação relativa, usando genes de referência como controles endógenos. Seis genes (*GAPDH*, *ACTB*, *UBC*, *HMBS*, *B2M* e *HPRT1*) foram escolhidos para serem testados como genes de referência, com o objetivo de avaliar quais deles apresentavam expressão mais estável na casuística de cada estudo. As características dos ensaios empregados para a avaliação da expressão dos genes de referência são apresentadas no **Quadro 6**.

**Quadro 6.** Características dos ensaios *Taqman*® empregados para avaliação da expressão dos genes de referência candidatos pela técnica de PCR em tempo real

Gene	Identidade do ensaio	Fragmento amplificado (pb)
<b>ACTB</b>	Hs01060665_g1	63
<b>B2M</b>	Hs00984230_m1	81
<b>GAPDH</b>	Hs00266705_g1	74
<b>HMBS</b>	Hs00609293_g1	62
<b>HPRT1</b>	Hs02800695_m1	82
<b>UBC</b>	Hs02800695_m1	135

*ACTB*: beta-actina; *B2M*: beta-2-microglobulina; *GAPDH*: gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase; *HMBS*: hidroximetil butirato sintase; *HPRT1*: hipoxantina fosforibosiltransferase 1; *UBC*: ubiquitina C; pb, pares de bases.

O teste do gene endógeno foi realizado por meio de PCR em tempo real, utilizando amostras de cDNA de indivíduos de ambos os gêneros e de cada tempo do estudo (pré-intervenção, 45 dias e 90 dias).

Os dados obtidos em ambos testes foram inseridos no qbasePLUS, versão 2.4 (*Biogazelle, Zwijnaarde, Belgium*), baseado no geNorm™

(Vandesompele *et al.*, 2002). Segundo o programa, os genes com maior estabilidade foram os genes HPRT1 e ACTB (beta-actina).

Os coeficientes foram considerados adequados para a condução dos experimentos, pois estavam dentro do valor de estabilidade de expressão aceitável para matrizes complexas ( $M \leq 1$ ), como o sangue, de acordo com Hellemans e colaboradores (2007).

### 3.2.9 Análises estatísticas

O banco de dados foi construído no programa SPSS versão 22.0. As análises foram realizadas no SPSS, Minitab versão 18 e Graphpad Prism versão 5.0. Para descrever o perfil da amostra segundo as diversas variáveis em estudo, foram feitas tabelas de frequência das variáveis categóricas apresentando o número de indivíduos e frequência em porcentagem entre parênteses. As variáveis numéricas foram apresentadas as médias geométricas e intervalo de confiança 95%. Quando não foi possível calcular a média geométrica, foi apresentada a mediana (Percentil 25 e Percentil 75).

Para comparar os valores das variáveis numéricas entre antes e após a intervenção com AF, foram utilizados testes de medidas repetidas (teste de Friedman ou ANOVA de medidas de repetidas). Quando houve diferença significativa anteriormente nos testes de medidas repetidas, foi utilizado testes de múltiplas comparações.

Vários modelos univariados de regressão linear foram utilizados para as várias dependentes: número de eventos de linfócitos NK (sem e com ativação); número de eventos de linfócitos B (sem e com ativação), número de eventos de linfócitos T CD4 (sem e com ativação) e número de eventos de linfócitos T CD8 (sem e com ativação). As variáveis independentes em cada modelo univariado foram: intervenção, folato sérico microbiológico, folato sérico LC/MS, 5-metiltetraidrofolato, UMFA, vitamina B12, PCR ultrasensível e cada citocina sérica estudada (IL-6, IL-8, IL-10, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ).

O nível de significância adotado para os testes estatísticos foi de  $\alpha$  de 5%, ou seja,  $p < 0,05$ .



## 4 RESULTADOS

As características gerais dos 34 indivíduos saudáveis incluídos no estudo estão apresentadas na **Tabela 3**.

**Tabela 3.** Características gerais dos 34 indivíduos saudáveis incluídos no estudo

	Indivíduos Saudáveis
Idade (anos)	27,6 (25,9 – 29,3)
Sexo feminino	22 (64,7)
Cor de pele autodeclarada	
Branca	27 (79,4)
Negra	1 (2,9)
Parda	5 (14,7)
Amarela	1 (2,9)
Índice de massa corporal (kg/m <sup>2</sup> )	22,9 (21,5 – 24,3)
Número de anos estudados (escolaridade)	18,5 (17,3 – 18,8)

Os dados do gênero e da cor de pele autodeclarada foram apresentados como número de indivíduos e porcentagem entre parênteses. Os dados da idade, índice de massa corporal e anos estudados foram apresentados como média geométrica (intervalo de confiança de 95%).

Os parâmetros hematológicos e bioquímicos de indivíduos saudáveis antes (baseline) e após a intervenção diária com 5 mg de AF por 90 dias estão apresentados na **Tabela 4**. Não foram observadas diferenças em relação a esses parâmetros antes e após 45 e 90 dias de uso de AF.



**Tabela 4.** Parâmetros hematológicos e bioquímicos de 34 indivíduos saudáveis antes e após o uso de 5 mg de ácido fólico por 90 dias

	<b>Baseline</b>	<b>45 dias</b>	<b>90 dias</b>	<b>P</b>
Hemácias (x10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup> )	4,78 (4,64 - 4,93)	4,77 (4,63 - 4,92)	4,73 (4,57 - 4,90)	0,339
Hemoglobina (g/dL)	14,3 (13,8 - 14,8)	14,3 (13,9 - 14,8)	14,2 (13,6 - 14,8)	0,906
Hematócrito (%)	42,5 (41,3 - 43,8)	42,7 (41,4 - 44,0)	42,3 (40,8 - 43,9)	0,748
VCM (fL)	89,0 (87,6 - 90,4)	89,4 (88,1 - 90,8)	89,5 (88,3 - 90,8)	0,056
HCM (pg)	29,9 (29,3 - 30,5)	30,1 (29,5 - 30,6)	30,0 (29,5 - 30,5)	0,644
CHCM (%)	33,6 (33,4 - 33,8)	33,6 (33,4 - 33,9)	33,5 (33,3 - 33,8)	0,651
RDW (%)	12,7 (12,4 - 13,1)	12,6 (12,3 - 12,9)	12,6 (12,3 - 12,9)	0,506
Leucócitos (x10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	6,0 (5,4 - 6,5)	6,2 (5,6 - 6,8)	6,1 (5,6 - 6,8)	0,086
Linfócitos (x10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	2,2 (2,0 - 2,4)	2,3 (2,1 - 2,5)	2,3 (2,1 - 2,6)	0,164
Plaquetas (x10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	244 (225 - 265)	237 (217 - 259)	233 (213 - 255)	0,396
PCRus (mg/dL)	0,08 (0,06 - 0,11)	0,09 (0,06 - 0,13)	0,10 (0,06 - 0,16)	0,371
Reticulócitos (%)	0,8 (0,6 - 1,0)	0,7 (0,6 - 0,9)	0,9 (0,7 - 1,1)	0,558

VCM: volume corpuscular médio; HCM: hemoglobina corpuscular média; CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média; RDW: amplitude de distribuição de eritrócitos; PCRus: proteína C reativa ultrasensível. Os valores das variáveis numéricas foram apresentados como média geométrica (intervalo de confiança de 95%). Os grupos foram comparados através de Teste de Friedman; quando significativo, foi aplicado o teste de múltiplas comparações de Dunn.

As concentrações de folato sérico, eritrocitário, UMFA e as formas 5-metil-THF, 5,10-metenil-THF e THF foram maiores após 45 e 90 dias de intervenção com 5mg/dia quando comparado com o período pré-intervenção (*baseline*), **Tabela 5**.

As concentrações de folato sérico foram cerca de 3,8 e 4,1 vezes maiores após 45 e 90 dias de uso de AF, respectivamente. No *baseline* a deficiência de folato foi de 14,7% entre os indivíduos incluídos. Não houve diferença nas concentrações de vitamina B12 antes e após o uso de AF.

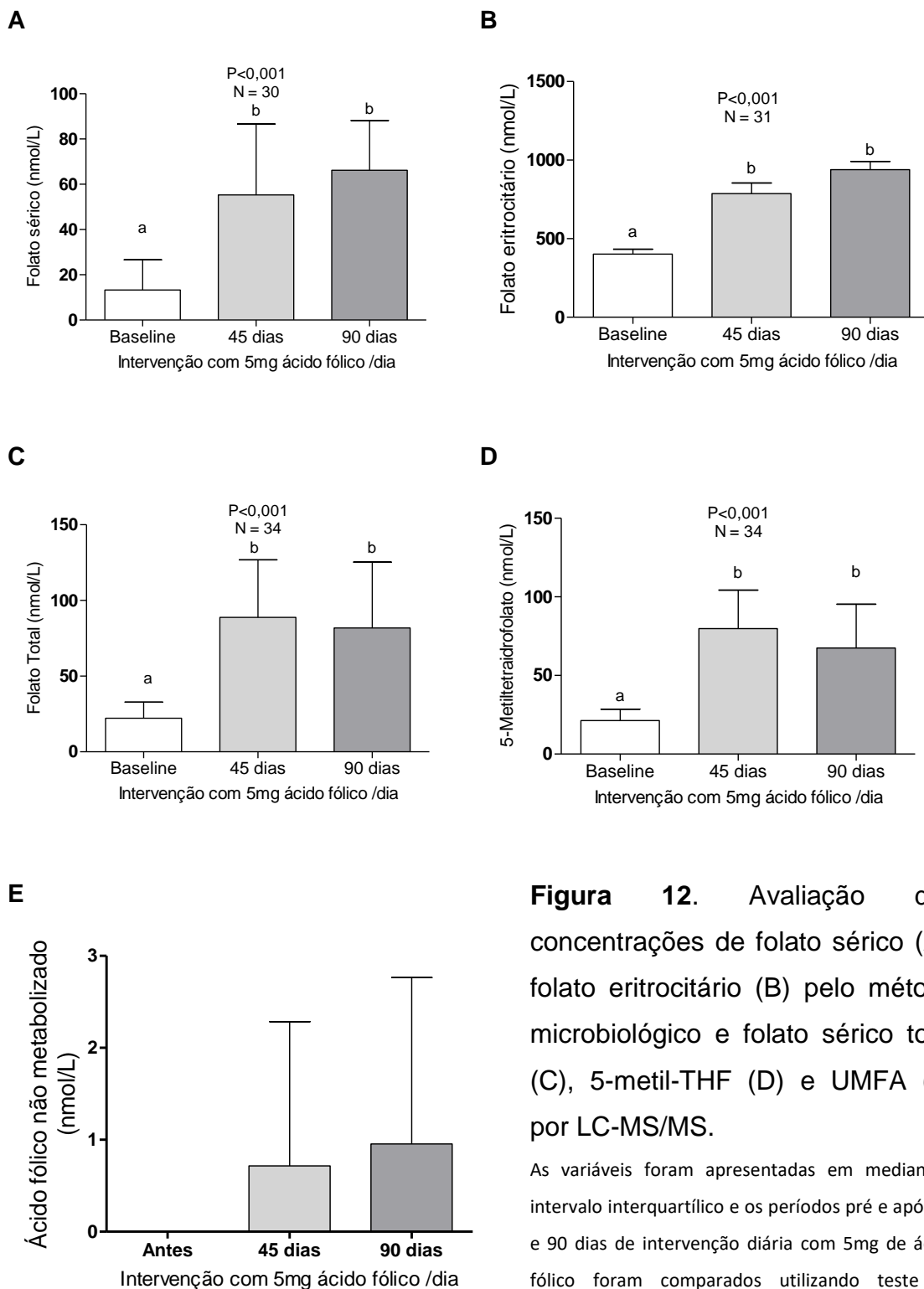
**Tabela 5.** Concentrações das vitaminas nos indivíduos saudáveis antes da intervenção e após 45 e 90 dias de uso diário de 5mg de ácido fólico

	<b>Baseline</b>	<b>Após 45 dias</b>	<b>Após 90 dias</b>	<b>P</b>
<b>Ensaio microbiológico</b>				
Folato sérico (nmol/L) N= 30	14,3 (11,2 – 18,2) <sup>a</sup>	54,3 (42,5 – 69,4) <sup>b</sup>	59,1 (46,8 – 74,7) <sup>b</sup>	<b>&lt;0,001</b>
Deficiência de Folato (<6,9 nmol/L)	5 (14,7) <sup>a</sup>	1 (3,1) <sup>b</sup>	1 (3,1) <sup>b</sup>	<b>&lt;0,001</b>
Folato Eritrocitário (nmol/L) N=31	342 (258 - 524) <sup>a</sup>	732 (591 – 993) <sup>b</sup>	978 (828 – 1127) <sup>b</sup>	<b>&lt;0,001</b>
Deficiência de Folato (<226,5 nmol/L)	3 (8,8) <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	<b>&lt;0,001</b>
Vitamina B <sub>12</sub> (pmol/L) N=33	355 (310- 406)	362 (318 – 414)	358 (317 – 403)	0,674
<b>Ensaio LC/MS-MS N=34</b>				
Folato total (nmol/L)	21,5 (18,0 – 25,8) <sup>a</sup>	79,5 (61,0 – 103,6) <sup>b</sup>	81,1 (64,7 – 101,6) <sup>b</sup>	<b>&lt;0,001</b>
5-metil-THF (nmol/L)	19,4 (16,0 – 23,4)	65,5 (51,7 – 82,8)	65,5 (53,4 – 80,2)	<b>&lt;0,001</b>
UFMA (nmol/L)	< lim. de detecção	0,71 (0 – 2,28)	0,95 (0 – 2,76)	*****
Hidróxi-Metil-THF (nmol/L)	1,61 (1,11 – 2,40) <sup>a</sup>	4,39 (2,94 – 8,29) <sup>b</sup>	5,85 (3,74 – 11,93) <sup>b</sup>	<b>&lt;0,001</b>
apABG (nmol/L)	0,40 (0,0 – 0,61) <sup>a</sup>	0,69 (0,43 – 1,19) <sup>b</sup>	0,76 (0,51 – 1,31) <sup>b</sup>	<b>&lt;0,001</b>

UMFA: ácido fólico não metabolizado; THF: tetraidrofolato; Hidróxi-Metil-THF: produto da oxidação do 5-metil-THF; apABG: p-acetamidobenzoilglutamato. Todos os indivíduos apresentaram valores inferiores aos limites de detecção (LOD limit of detection). As variáveis numéricas foram apresentadas em mediana e intervalo interquartilico (entre parênteses) e os tempos foram comparados utilizando teste de Friedman e, quando significativo, foi realizado o teste pós-hoc de múltiplas comparações de Dunn. Letras diferentes demonstram diferença significativa entre os tempos de intervenção.

As concentrações de folato sérico e folato eritrocitário pelo método microbiológico e de folato sérico total e 5-metil-THF por LC-MS/MS estão apresentadas na **Figura 12**.

As concentrações de folato total e o 5-metil-THF que foram quantificados por LC-MS/MS, também tiveram aumento significativo quando comparado com o período anterior a intervenção e após 45 e 90 dias de uso de 5mg AF.



**Figura 12.** Avaliação das concentrações de folato sérico (A), folato eritrocitário (B) pelo método microbiológico e folato sérico total (C), 5-metil-THF (D) e UMFA (E) por LC-MS/MS.

As variáveis foram apresentadas em mediana e intervalo interquartilico e os períodos pré e após 45 e 90 dias de intervenção diária com 5mg de ácido fólico foram comparados utilizando teste de Friedman e, quando significativo, foi realizado o teste *pós-hoc* de múltiplas comparações de Dunn. Letras diferentes demonstram diferença significativa entre os grupos

#### 4.1 DETERMINAÇÃO DA ATIVAÇÃO DOS LINFÓCITOS

O número de eventos de linfócitos NK, B, T CD4 e T CD8 antes e após o uso diário de 5 mg de AF estão apresentados na **Tabela 6 e 7**.

Inicialmente serão apresentados os dados dos linfócitos de indivíduos saudáveis antes e após o uso de 5 mg/dia de AF sem ativação das células na **Tabela 6**.

Nas células que não foram submetidas a ativação, a intervenção com 5 mg diárias de AF não foi associada ao número de eventos de linfócitos NK e B. Por outro lado, o uso de 5mg/dia de AF foi associado com o aumento no número de eventos de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e com a redução de número de eventos de linfócitos T CD8<sup>+</sup> após 90 dias de intervenção (**Tabela 6**).

**Tabela 6.** Número de eventos dos linfócitos após incubação sem ativação nos indivíduos saudáveis antes e após o uso de 5 mg/dia de ácido fólico

Linfócitos	<i>Baseline</i>	Após 45 dias	Após 90 dias	<i>P</i> *
<b>NK (n=20)</b>	640 (439 – 1194)	927 (512 -1246)	759 (479 – 1326)	0,951
<b>B (n=25)</b>	334 (190 – 581)	372 (175 – 558)	329 (175 – 412)	0,080
<b>T CD4<sup>+</sup> (n=18)</b>	5.003 (2.052-658) <sup>a</sup>	4.793 (3.299–6.180) <sup>a</sup>	8.656 (6.166-10.472) <sup>b</sup>	<b>0,006</b>
<b>T CD8<sup>+</sup> (n=22)</b>	2.621 (1.727 – 6612) <sup>a</sup>	2.224 (1.353 – 3.139) <sup>a</sup>	1.478 (990 – 2.676) <sup>b</sup>	<b>0,022</b>
<b>Razão CD4/CD8 (n=21)</b>	2.42 (1.70 – 2.83)	2.48 (1.80 – 3.01)	10.8 (5.98 – 20.9)	<b>&lt;0,001</b>

Dados foram apresentados como mediana (P25 – P75). \*Teste de Friedman. Quando *P* <0,05, foi aplicado o teste de múltiplas comparações de Dunn. Letras diferentes demonstram diferença entre os tempos de intervenção.

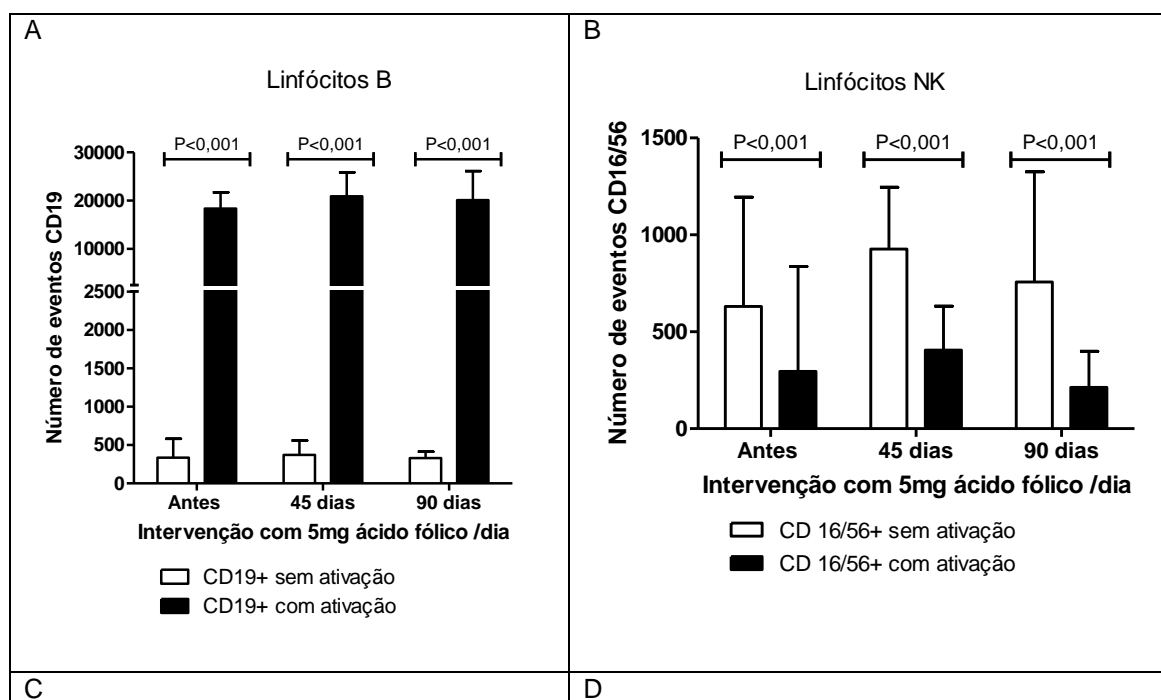
Já na **Tabela 7** estão apresentados os dados dos linfócitos de indivíduos saudáveis antes e após o uso de 5 mg/dia de AF com a ativação por PMA e ionomicina. Nas células que foram submetidas a este protocolo, não foram observadas diferenças na contagem de eventos entre o período anterior (*Baseline*) e após 45 e 90 dias de uso do AF.

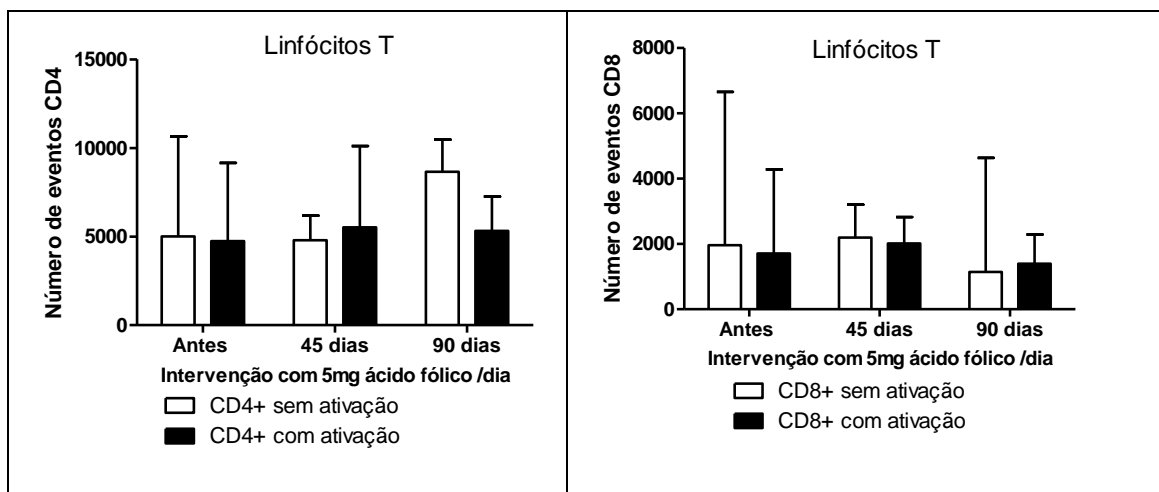
**Tabela 7.** Número de eventos dos linfócitos após ativação ( PMA + ionomicina) em indivíduos saudáveis antes e após o uso de 5 mg/dia de ácido fólico

Linfócitos	Baseline	Após 45 dias	Após 90 dias	P*
<b>NK (n=25)</b>	295 (48-837)	406 (173-632)	213 (105 -399)	0,326
<b>B (n=26)</b>	18.340 (14.230 - 21.720)	20.900 (15.270 - 25.860)	20.130 (16.010 - 26.120)	0,354
<b>T CD4 (n=19)</b>	4.617 (1.810 – 8.786)	5.611 (3.136 – 10.400)	5.164 (3.402 – 7.206))	0,952
<b>T CD8 (n=20)</b>	1.727 (420 – 4.285)	2.019 (1.098 – 2.826)	1.396 (768 – 2.291)	0,946
<b>Razão CD4/CD8 (n=8)</b>	4.23 (1.96 – 5.85)	4.22 (0.68 – 7.36)	3.00 ( 2.14 – 3.96)	0,794

PMA: 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato. Dados apresentados como mediana (P25 – P75). \*Teste de Friedman.

Na **Figura 13**, podemos observar que a ativação causou uma proliferação de linfócitos B, pois o número de eventos de linfócitos B foi cerca de 50 vezes maior no ensaio onde as células foram ativadas com PMA e ionomicina do que quando comparadas com as células não foram ativadas. Já quando comparamos os linfócitos NK ativados e não ativados, observamos que a ativação causou uma redução na quantidade de células.

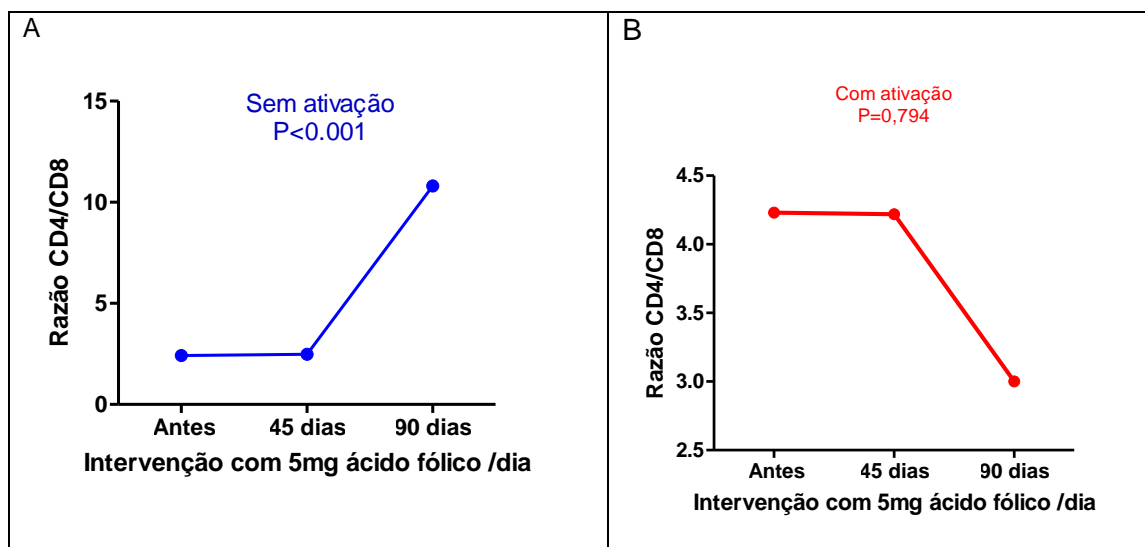




**Figura 13.** Número de eventos dos linfócitos sem ativação e com ativação em indivíduos saudáveis antes e após o uso de 5 mg/dia de ácido fólico.

Dados apresentados como mediana (P25 – P75). \*Teste de Friedman.

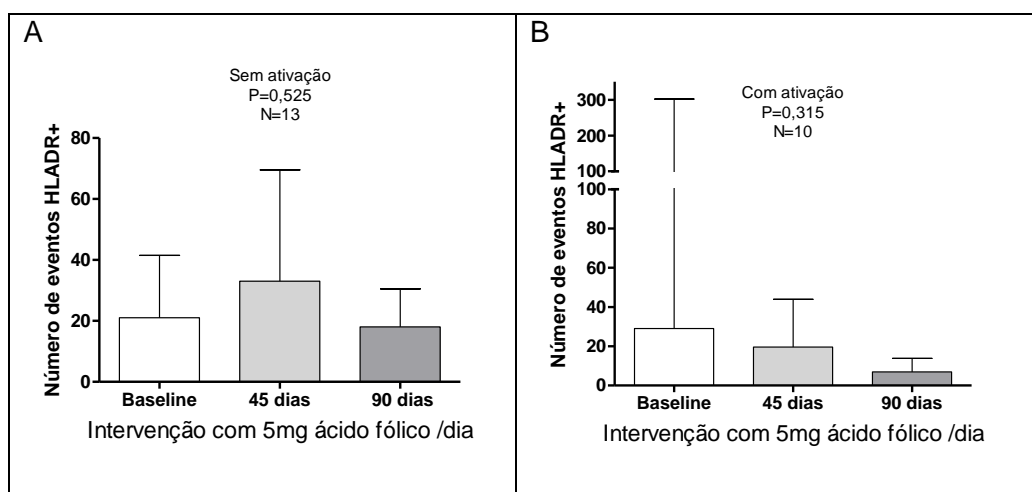
A razão de linfócitos CD4 e CD8 foi calculada a partir dos valores de número de eventos de CD4 e CD8. Observou-se que nas células sem ativação a razão CD4/CD8 aumentou após 90 dias de uso de AF. As razões CD4/CD8 nas células ativadas foram cerca de 2 vezes maiores que nas células sem ativação no baseline. A razão CD4/CD8 nas células sem ativação aumentou cerca de 4 vezes após 90 dias de uso de AF (A). Nas células ativadas não foi observado diferença na razão CD4/CD8 com a intervenção com AF (B) (**Figura 14**).

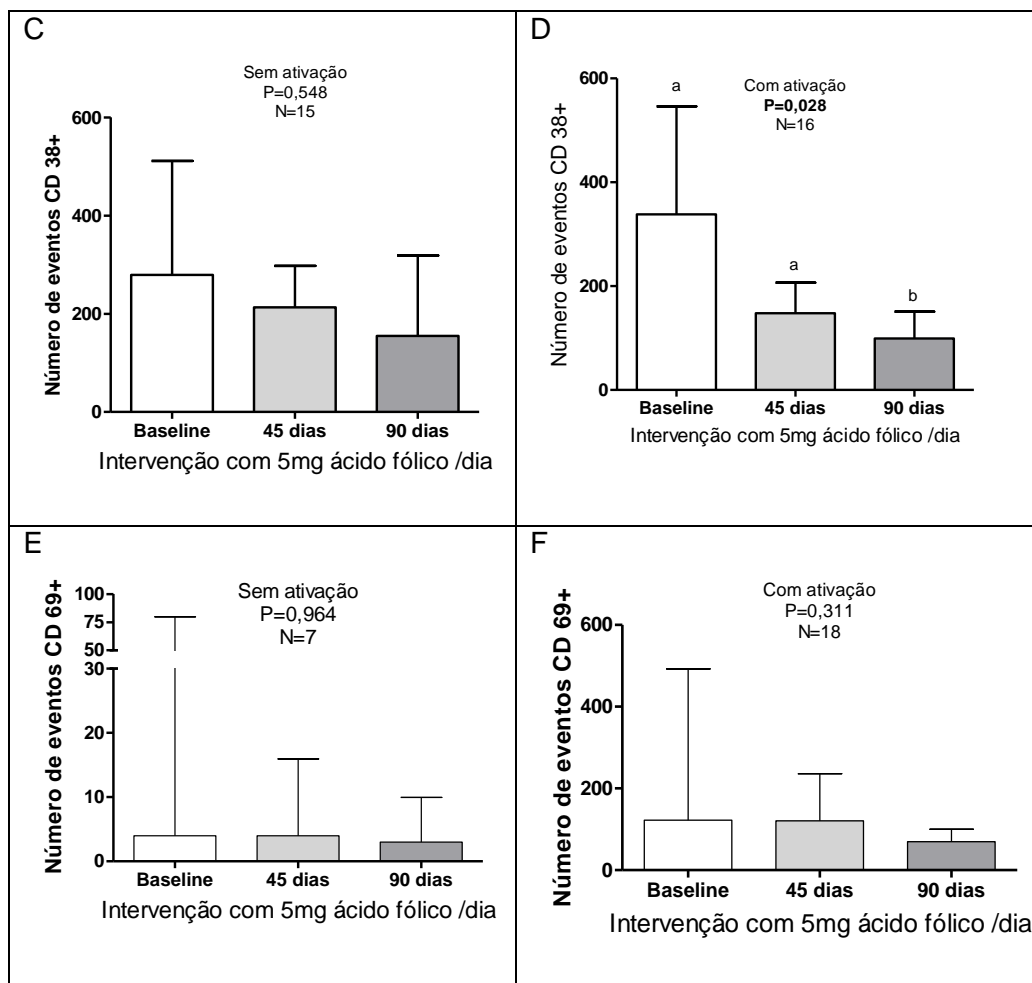


**Figura 14.** Razão de linfócitos T CD4 e linfócitos T CD8 sem ativação e com ativação nos indivíduos saudáveis submetidos ao uso de 5 mg/dia de ácido fólico.

Para avaliar se havia diferença entre células ativadas e não ativadas, utilizamos anticorpos específicos de ativação (HLA-DR / CD38 e CD69). Não foi observada diferença no número de eventos para os anticorpos de ativação HLADR+, CD38+ e CD69+ nos linfócitos NK sem ativação. Nem tampouco houve diferença nas células ativadas marcadas com HLADR+ e CD 69+. Entretanto, nas células com ativação, o número de eventos marcados com CD38+ diminuiu com 90 dias de uso de AF (**Figura 15**).

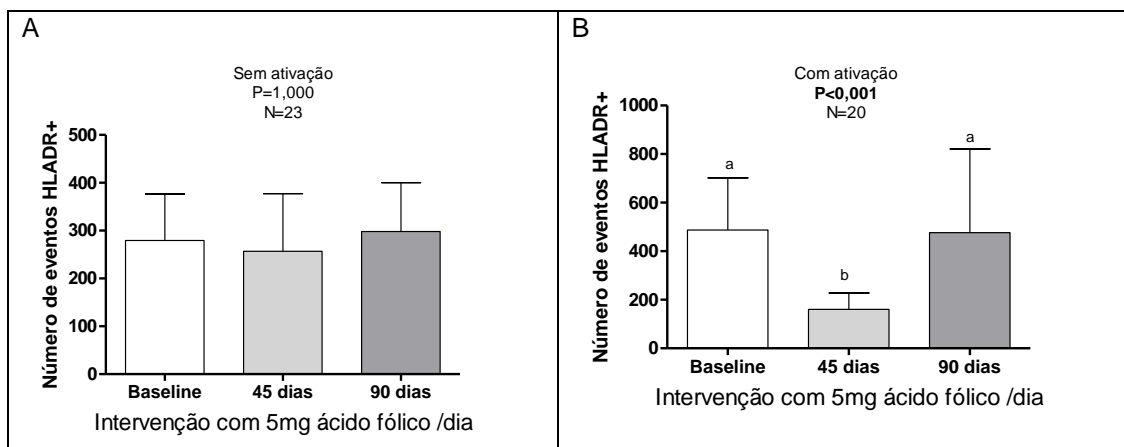
A **Figura 16** mostra o número de eventos dos linfócitos B. O número de eventos marcados para o anticorpo HLA-DR não foi diferente antes e depois do uso de AF nas células sem ativação (A). Nas células ativadas foi observado uma diferença aos 45 dias de uso de AF (B). Para o anticorpo CD38, o número de eventos antes e depois do uso de AF, para células com e sem ativação não foram diferentes (C e D). Já para as células sem ativação e marcadas com o anticorpo anti-CD69, houve diminuição no número de eventos após 90 dias de uso de AF (E), mas este efeito não foi observado nas células ativadas (F).



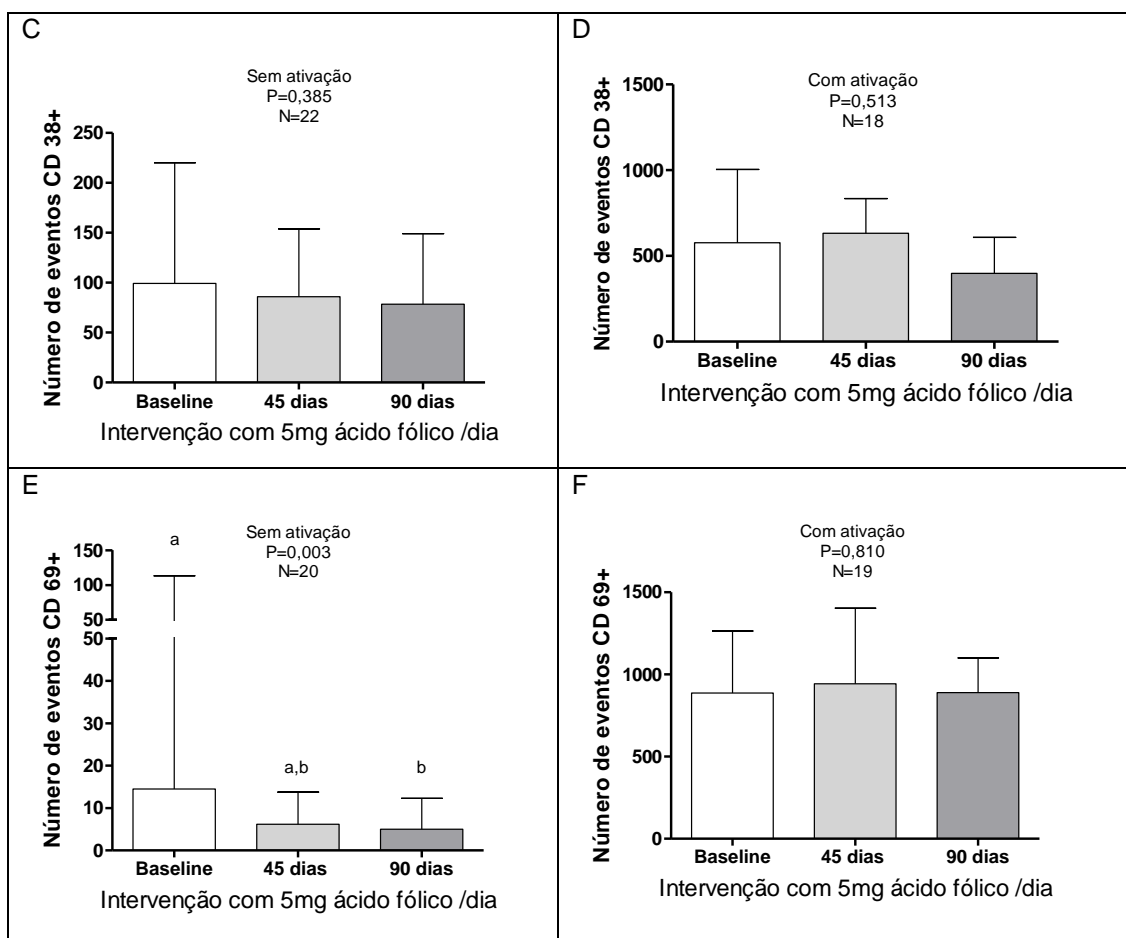


**Figura 15.** Avaliação da ativação dos linfócitos NK (CD56/CD16) utilizando marcadores específicos de ativação HLA-DR (A e B); CD38 (C e D) e CD69 (E e F) com DMSO (sem ativação) e PMA + ionomicina (com ativação).

As variáveis foram apresentadas em mediana e intervalo interquartilico e os períodos pré e após 45 e 90 dias de intervenção diária com 5mg de ácido fólico foram comparados utilizando teste de Friedman e, quando significativo, foi realizado o teste *pós-hoc* de múltiplas comparações de Dunn. Letras diferentes demonstram diferença significativa entre os grupos. Em negrito foram apresentados os valores de  $P < 0,05$ . O número de amostras analisadas foi menor que o número de indivíduos incluídos devido as dificuldades enfrentadas com a técnica *in vitro*, a qual precisava ser realizada no dia. Outro motivo que justifica a perda de casos foi a quantidade insuficiente de células mononucleares obtidas em alguns indivíduos.





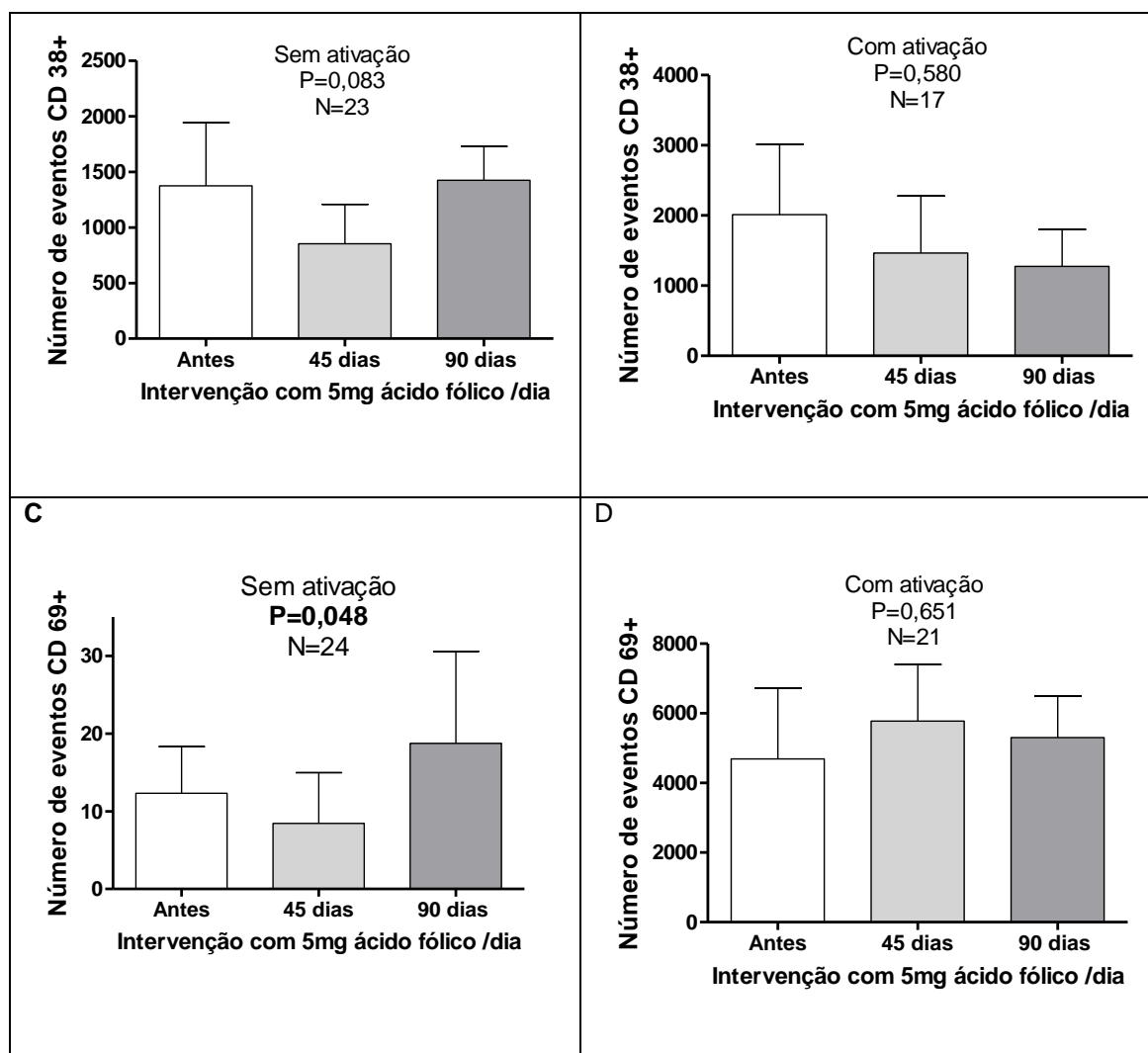


**Figura 16.** Avaliação da ativação dos linfócitos B (CD19) utilizando marcadores específicos de ativação HLA-DR (A e B); CD38 (C e D) e CD69 (E e F) com DMSO (sem ativação) e PMA + ionomicina (com ativação).

As variáveis foram apresentadas em mediana e intervalo interquartilico e os períodos pré e após 45 e 90 dias de intervenção diária com 5mg de ácido fólico foram comparados utilizando teste de Friedman e, quando significativo, foi realizado o teste pos-hoc de múltiplas comparações de Dunn. Letras diferentes demonstram diferença significativa entre os grupos. Em negrito foram apresentados os valores de  $P < 0,05$ .

Quando avaliamos a ativação de linfócitos T, através dos anticorpos de ativação CD38 e CD69, foi possível observar um aumento dos linfócitos T CD4/69 após 90 dias de uso de AF, quando as células não foram ativadas (**Figura 17C**). Em relação aos linfócitos T CD8+, verificou-se que a ativação com o anticorpo CD38, foi menor após 90 dias de uso de AF, nas células sem ativação (**Figura 18A**).

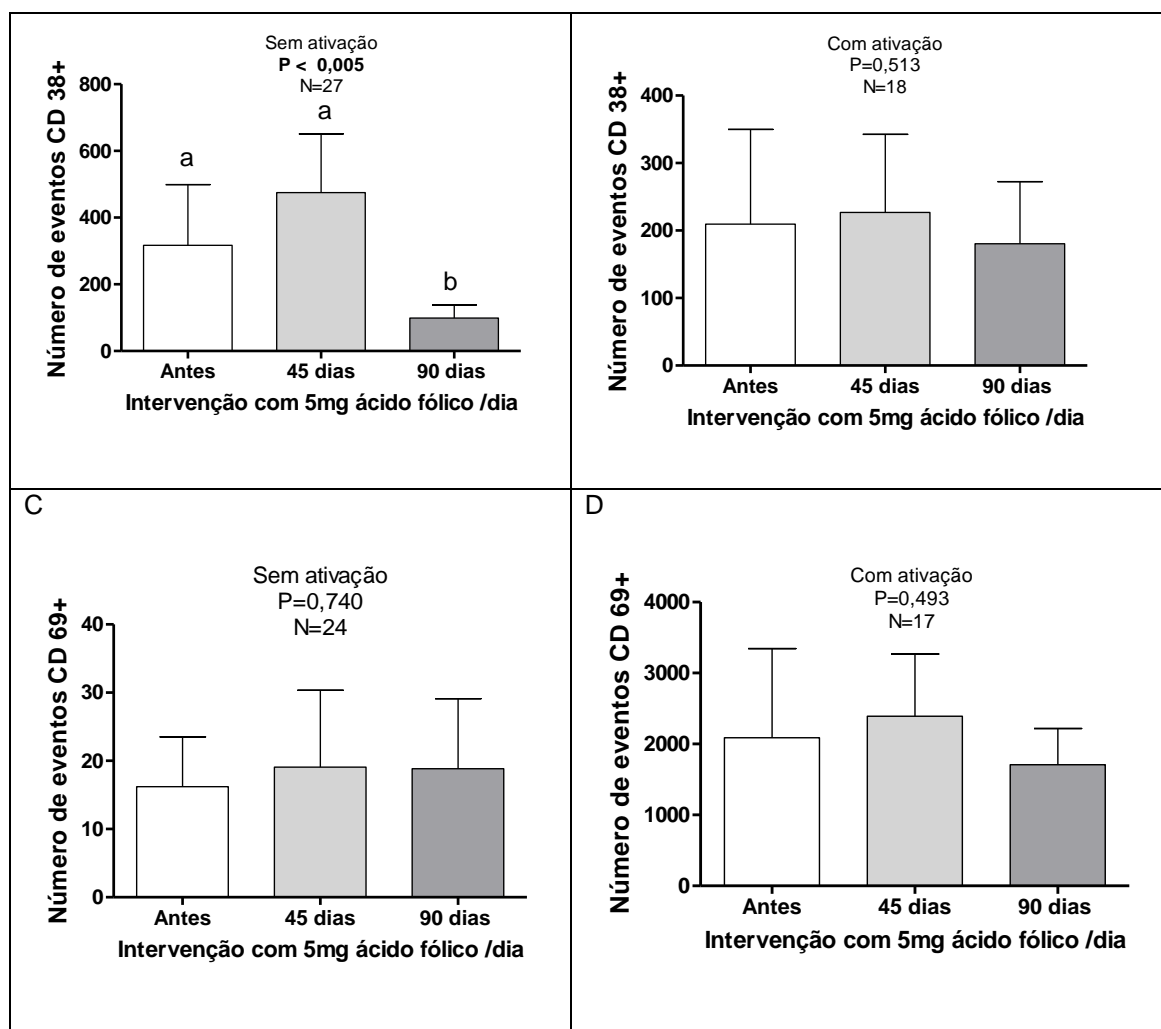
A	B
---	---



**Figura 17.** Avaliação da ativação dos linfócitos T (CD4) utilizando marcadores específicos de CD38 (A e B) e CD69 (C e D) com DMSO (sem ativação) e PMA + ionomicina (com ativação).

As variáveis foram apresentadas em mediana e intervalo interquartilico e os períodos pré e após 45 e 90 dias de intervenção diária com 5mg de ácido fólico foram comparados utilizando teste de Friedman e, quando significativo, foi realizado o teste pos-hoc de múltiplas comparações de Dunn's. Letras diferentes demonstram diferença significativa entre os grupos. Em negrito foram apresentados os valores de  $P < 0,05$ .

A	B
---	---

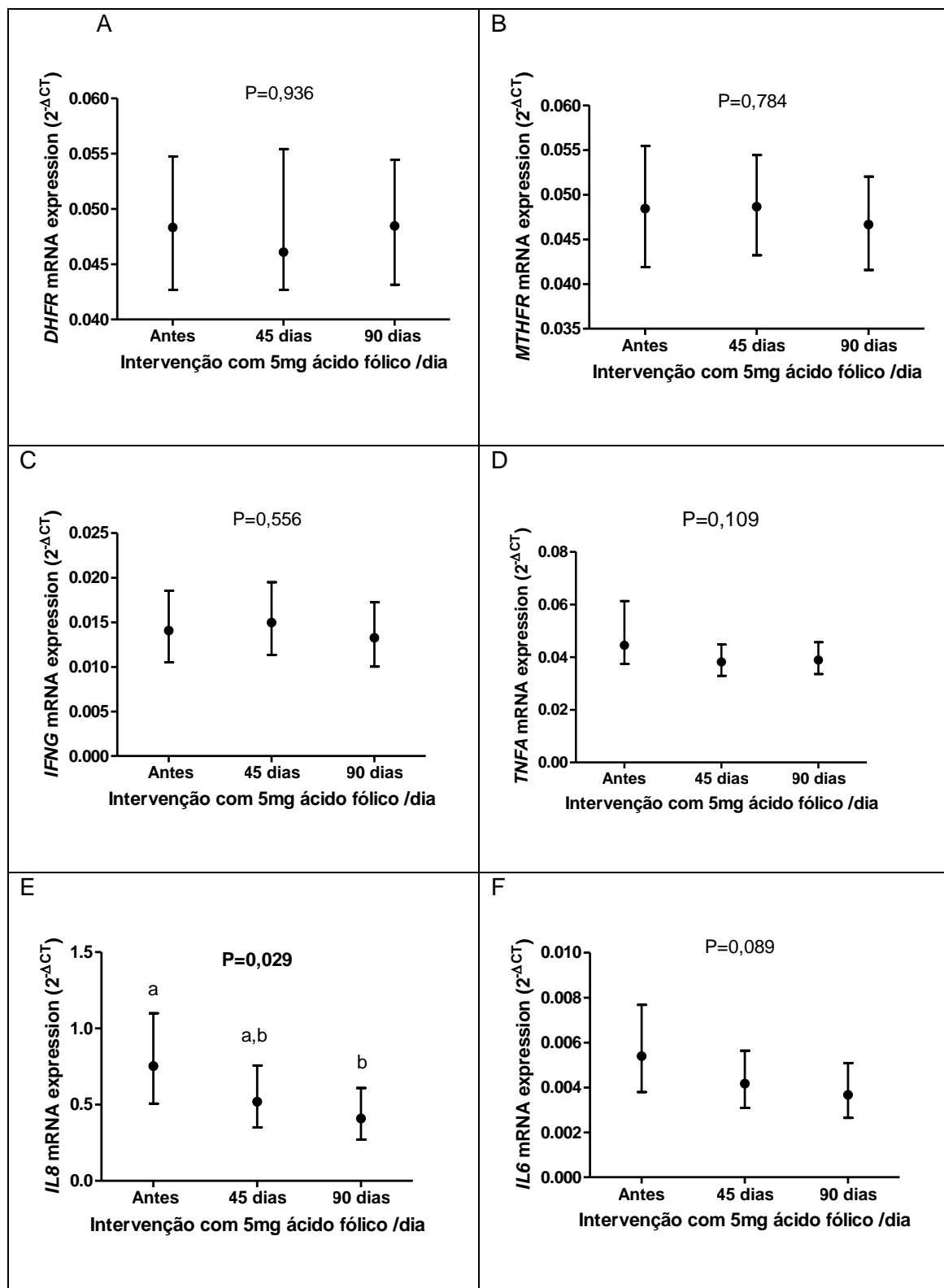


**Figura 18.** Avaliação da ativação dos linfócitos T (CD8) utilizando marcadores específicos de CD38 (A e B) e CD69 (C e D) com DMSO (sem ativação) e PMA + ionomicina (com ativação).

As variáveis foram apresentadas em mediana e intervalo interquartilico e os períodos pré e após 45 e 90 dias de intervenção diária com 5mg de ácido fólico foram comparados utilizando teste de Friedman e, quando significativo, foi realizado o teste pos-hoc de múltiplas comparações de Dunn. Letras diferentes demonstram diferença significativa entre os grupos. Em negrito foram apresentados os valores de  $P < 0,05$ .

#### 4.2 EXPRESSÕES DE RNAm DOS GENES DHFR, MTHFR, IFNG, TNFA, IL8 E IL6

Com relação as expressões de RNAm dos genes investigados, não foram observadas diferenças entre os tempos para as expressões de RNAm de genes de *DHFR*, *MTHFR* e *IFNG* e *IL6*. Contudo, a expressão de *IL8* diminuiu após 90 dias de uso de AF, conforme demonstrado na **Figura 19**.



**Figura 19.** Expressões do RNAm dos genes de *DHFR* (A), *MTHFR* (B), *IFNG* (C), *TNFA* (D), *IL8* (E) e *IL6* (F) de indivíduos saudáveis, antes e após 45 e 90 dias de intervenção com 5mg diária de ácido fólico.

Os dados estão apresentados com média geométrica e IC 95%. Os períodos pré e após 45 e 90 dias de intervenção diária com 5mg de ácido fólico foram comparados utilizando o teste de Friedman e, quando significativo, foi realizado o teste pos-hoc de múltiplas comparações de Dunn.

## 4.2 DOSAGEM DAS CITOCINAS SÉRICAS

Não foram observadas diferenças nas concentrações séricas das citocinas IL-6, IL-8, IL-10, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  entre os períodos antes e após 45 e 90 dias de intervenção com 5mg de AF. Foi encontrada uma tendência para relação positiva entre o uso de AF e as concentrações de IL-6, porém não significativa estatisticamente ( $P=0,079$ ) (**Tabela 8**).

**Tabela 8.** Concentrações das citocinas inflamatórias nos 34 indivíduos saudáveis antes e após 45 e 90 dias de intervenção com ácido fólico 5mg/dia

	Baseline	Após 45 dias	Após 90 dias	$P^*$
IL-6 (pg/mL)	0,59(0,35 - 0,83)	0,66(0,45 - 0,88)	0,80(0,57 - 1,03)	0,079
IL-8 (pg/mL)	2,48(2,36 - 2,59)	2,49(2,38 - 2,62)	2,51(2,39 - 2,64)	0,789
IL-10 (pg/mL)	2,48(2,27 - 2,69)	2,45(2,23 - 2,66)	2,45(2,23 - 2,67)	0,829
IFN- $\gamma$ (pg/mL)	3,00(2,77 - 3,23)	3,01(2,79 - 3,24)	3,04(2,81 - 3,26)	0,868
TNF- $\alpha$ (pg/mL)	2,02(1,92 - 2,12)	2,02(1,91 - 2,13)	2,02(1,89 - 2,16)	0,997

PCR: proteína C reativa; IL: interleucina; IFN- $\gamma$ : interferon- $\gamma$ ; TNF- $\alpha$ : fator de necrose tumoral- $\alpha$ . As variáveis numéricas foram convertidas por transformação Box-Cox e apresentadas em média e intervalo de confiança de 95% (entre parênteses) após reconversão. \*ANOVA de medidas repetidas.

## 4.3 REGRESSÕES LINEARES UNIVARIADAS

Onze modelos de regressão linear univariada, para as variáveis dependentes número de células NK, linfócitos B, linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> (eventos) com ativação por PMA e ionomicina e sem ativação, foram realizados com os dados de 34 indivíduos saudáveis durante o uso de 5mg/dia de AF. Os modelos de regressão estão apresentados na **Tabela 9 a 16**.

Quando considerado o grupo total (*baseline*, após 45 e após 90 dias de uso de 5mg/dia), o aumento nas concentrações de IFN- $\gamma$  foi diretamente associado ao aumento de eventos de células NK, como observado no modelo 10 apresentado na **Tabela 9**.

**Tabela 9.** Modelos de regressão linear univariados para a variável dependente número de eventos de células NK<sup>1</sup> sem ativação

Modelo	Variável Independente	$\beta$	SE	P
1	Intervenção diária com 5mg de ácido fólico	- 0,036	0,167	0,829
2	Folato sérico	- 0,004	0,005	0,482
3	5-metil-THF	- 0,002	0,003	0,588
4	UMFA	0,002	0,003	0,532
5	Vitamina B12	0,0003	0,001	0,822
6	PCRus	- 0,515	0,429	0,235
7	IL6	- 0,030	0,073	0,683
8	IL8	0,023	0,074	0,755
9	IL-10	0,034	0,019	0,081
10	IFN- $\gamma$	0,020	0,009	<b>0,021</b>
11	TNF- $\alpha$	0,010	0,052	0,855

<sup>1</sup>A variável dependente foi transformada por Box-Cox ( $\lambda = 0$ ). AF: ácido fólico; THF: tetraidrofolato; UMFA: ácido fólico não metabolizado; PCRus: proteína C reativa ultrassensível; IL: interleucina; IFN- $\gamma$ : interferon- $\gamma$ ; TNF- $\alpha$ : fator de necrose tumoral- $\alpha$ .

No modelo 11 da regressão linear apresentado na **Tabela 10**, observou-se uma relação inversa próxima a significância, entre a variável dependente número de eventos das células NK com ativação e a variável independente TNF- $\alpha$  (P=0,086).

**Tabela 10.** Modelos de regressão linear univariados para a variável dependente número de eventos das células NK ativadas dos 34 indivíduos saudáveis

Modelo	Variável Independente	$\beta$	SE	P
1	Intervenção diária com 5mg de ácido fólico	- 0,152	0,187	0,419
2	Folato sérico	- 0,002	0,005	0,747
3	5-metil-THF	- 0,005	0,004	0,180
4	UMFA	0,001	0,003	0,685
5	Vitamina B12	- 0,0002	0,001	0,843
6	PCRus	- 0,685	0,536	0,205
7	IL-6	- 0,047	0,086	0,926
8	IL-8	0,008	0,090	0,604
9	IL-10	0,012	0,021	0,582
10	IFN- $\gamma$	- 0,003	0,010	0,782
11	TNF- $\alpha$	- 0,109	0,063	0,086

<sup>1</sup>A variável dependente foi transformada por Box-Cox ( $\lambda = 0$ ). THF: tetraidrofolato; UMFA: ácido fólico não metabolizado; PCRus: proteína C reativa ultrassensível; IL: interleucina; IFN- $\gamma$ : interferon- $\gamma$ ; TNF- $\alpha$ : fator de necrose tumoral- $\alpha$ .

No modelo 9 da **Tabela 11**, o aumento de uma unidade de IL-10 (em pg/ml da) foi associado a redução de 0,033 no número de eventos de Linfócitos B sem ativação, enquanto que no modelo 4 houve uma proximidade na significância, com relação positiva entre o incremento de uma unidade de UMFA (nmol/L) e o aumento do número de eventos de linfócitos B sem ativação.

**Tabela 11.** Modelos de regressão linear univariados para a variável dependente número de eventos dos linfócitos B sem ativação de 34 indivíduos saudáveis

Modelo	Variável Independente	$\beta$	SE	P
1	Intervenção diária com 5mg de Ácido Fólico	- 0,087	0,093	0,350
2	Folato sérico	0,0001	0,002	0,952
3	5-metil-THF	- 0,0002	0,002	0,936
4	<b>UMFA</b>	<b>0,003</b>	<b>0,002</b>	<b>0,055</b>
5	Vitamina B12	- 0,001	0,001	0,126
6	PCRus	0,341	0,296	0,252
7	IL-6	0,023	0,061	0,702
8	IL-8	- 0,056	0,045	0,211
9	IL-10	- 0,033	0,011	<b>0,003</b>
10	IFN- $\gamma$	- 0,001	0,005	0,917
11	TNF- $\alpha$	- 0,031	0,031	0,325

<sup>1</sup>A variável dependente foi transformada por Box-Cox ( $\lambda = 0$ ). THF: tetraidrofolato; UMFA; ácido fólico não metabolizado; PCRus: proteína C reativa ultrasensível; IL: interleucina; IFN- $\gamma$ : interferon- $\gamma$ ; TNF- $\alpha$ : fator de necrose tumoral- $\alpha$ .

No modelo 9, a regressão mostrou uma relação positiva próxima a significância ( $P=0,072$ ) para a variável independente IL-10 e número de eventos dos linfócitos B. (**Tabela 12**).

**Tabela 12.** Modelos de regressão linear univariados para a variável dependente número de linfócitos B (eventos) com ativação de 34 indivíduos saudáveis

Modelo	Variável Independente	$\beta$	SE	P
1	Intervenção diária com 5mg de Ácido Fólico	968,769	1121,62	0,390
2	Folato sérico	45,351	25,987	0,085
3	5-metil-THF	18,026	23,205	0,440
4	UMFA	14,286	21,109	0,501
5	Vitamina B12	5,252	7,788	0,502
6	PCRus	1572,395	3617,220	0,665
7	IL-6	390,060	710,185	0,595
8	IL-8	-780,880	539,002	0,152
9	IL-10	248,022	135,559	0,072
10	IFN- $\gamma$	58,773	60,682	0,336
11	TNF- $\alpha$	-483,024	371,349	0,197

<sup>1</sup>A variável dependente foi transformada por Box-Cox ( $\lambda = 1$ ). THF: tetraidrofolato; UMFA: ácido fólico não metabolizado; PCR: proteína C reativa ultrasensível; IL: interleucina; IFN- $\gamma$ : interferon- $\gamma$ ; TNF- $\alpha$ : fator de necrose tumoral- $\alpha$ .

Observou-se que a intervenção diária com 5mg de AF, modelo 1 de regressão linear univariada apresentado da **Tabela 13**, foi associada ao incremento de 9,837 no número de eventos dos linfócitos T CD4+ não ativados.

**Tabela 13.** Modelos de regressão linear univariados para a variável dependente número de linfócitos T CD4+ (eventos) sem ativação de 34 indivíduos saudáveis

Modelo	Variável Independente	$\beta$	SE	P
1	Intervenção diária com 5mg de Ácido Fólico	9,837	3,976	<b>0,017</b>
2	Folato sérico	0,093	0,116	0,425
3	5-metil-THF	0,049	0,085	0,564
4	UMFA	0,039	0,591	0,948
5	Vitamina B12	0,001	0,028	0,974
6	PCRus	8,040	10,277	0,438
7	IL-6	1,517	1,963	0,443
8	IL-8	- 2,732	1,775	0,130
9	IL-10	0,734	0,432	0,097
10	IFN- $\gamma$	0,333	0,315	0,297
11	TNF- $\alpha$	- 0,823	1,330	0,539

<sup>1</sup>A variável dependente foi transformada por Box-Cox ( $\lambda = 0,5$ ). THF: tetraidrofolato; UMFA: ácido fólico não metabolizado; PCR: proteína C reativa ultrasensível; IL: interleucina; IFN- $\gamma$ : interferon- $\gamma$ ; TNF- $\alpha$ : fator de necrose tumoral- $\alpha$ .



Na **Tabela 14**, o modelo 5 de regressão linear univariada mostrou relação positiva entre a variável independente vitamina B12 e a variável dependente número de eventos dos linfócitos T CD4+ ativados.

**Tabela 14.** Modelos de regressão linear univariados para a variável dependente número de eventos dos linfócitos T CD4+ ativados de 34 indivíduos saudáveis

Modelo	Variável Independente	$\beta$	SE	P
1	Intervenção diária com 5mg de Ácido Fólico	2,432	4,468	0,558
2	Folato sérico	-0,039	0,119	0,743
3	5-metil-THF	0,029	0,090	0,752
4	UMFA	-0,613	0,661	0,358
5	Vitamina B12	0,068	0,028	<b>0,018</b>
6	PCRus	11,958	14,607	0,417
7	IL-6	0,003	2,224	0,999
8	IL-8	1,153	1,948	0,556
9	IL-10	0,172	0,482	0,722
10	IFN- $\gamma$	-0,331	0,351	0,349
11	TNF- $\alpha$	0,401	1,451	0,783

<sup>1</sup>A variável dependente foi transformada por Box-Cox ( $\lambda = 0,5$ ). THF: tetraidrofolato; UMFA: ácido fólico não metabolizado; PCR: proteína C reativa ultrasensível; IL: interleucina; IFN- $\gamma$ : interferon- $\gamma$ ; TNF- $\alpha$ : fator de necrose tumoral- $\alpha$ .

Na **Tabela 15**, o modelo 3 de regressão linear univariada mostrou relação negativa entre a variável independente 5-metil-THF e a variável dependente número de eventos dos linfócitos T CD8+ não ativados, enquanto no modelo 10, houve uma relação positiva entre o IFN- $\gamma$  e a variável dependente. Ainda avaliando o modelo de regressão linear univariada observou-se associação positiva próxima a significância entre IL-10 e o número de linfócitos T CD8+ (eventos) sem ativação ( $P=0,057$ ).

**Tabela 15.** Modelos de regressão linear univariados para a variável dependente número de linfócitos T CD8+ (eventos) sem ativação de 34 indivíduos saudáveis

Modelo	Variável Independente	$\beta$	SE	P
1	Intervenção diária com 5mg de Ácido Fólico	- 0,539	0,140	<0,0001
2	Folato sérico	- 0,001	0,003	0,717
3	5-metil-THF	- 0,006	0,003	<b>0,041</b>
4	UMFA	0,007	0,012	0,545
5	Vitamina B12	- 0,001	0,001	0,392
6	PCRus	- 0,379	0,417	0,367
7	IL-6	0,070	0,075	0,351
8	IL-8	- 0,038	0,072	0,602
9	IL-10	0,033	0,017	0,057
10	IFN- $\gamma$	0,022	0,009	<b>0,012</b>
11	TNF- $\alpha$	- 0,027	0,049	0,587

<sup>1</sup>A variável dependente foi transformada por Box-Cox ( $\lambda = 0$ ). THF: tetraidrofolato; UMFA: ácido fólico não metabolizado; PCR: proteína C reativa ultrassensível; IL: interleucina; IFN- $\gamma$ : interferon- $\gamma$ ; TNF- $\alpha$ : fator de necrose tumoral- $\alpha$ .

No modelo 2 de regressão linear univariada apresentado na **Tabela 16**, foi demonstrado uma relação direta entre o aumento de uma unidade de folato sérico e o aumento de 0,152 no número de eventos dos linfócitos T CD8+ ativados, enquanto no modelo 8, houve uma relação inversa, próxima a significância, entre o aumento de uma unidade de IL-8 e a redução do número de eventos dos linfócitos T CD8+ ativados (**Tabela 16**).

**Tabela 16.** Modelos de regressão linear univariados para a variável dependente número de linfócitos T CD8+ (eventos) com ativação de 34 indivíduos saudáveis

Modelo	Variável Independente	$\beta$	SE	P
1	Intervenção diária com 5mg de Ácido Fólico	2,272	3,311	0,495
2	Folato sérico	0,152	0,073	<b>0,042</b>
3	5-metil-THF	0,034	0,068	0,613
4	UMFA	0,293	0,241	0,228
5	Vitamina B12	- 0,009	0,021	0,661
6	PCRus	- 10,437	8,549	0,227
7	IL-6	- 0,867	1,645	0,600
8	IL-8	- 2,946	1,613	0,073
9	IL-10	0,328	0,396	0,411
10	IFN- $\gamma$	- 0,016	0,225	0,943
11	TNF- $\alpha$	- 1,037	0,991	0,300

<sup>†</sup>A variável dependente foi transformada por Box-Cox ( $\lambda = 0,5$ ). THF: tetraidrofolato; UMFA: ácido fólico não metabolizado; PCR: proteína C reativa ultrasensível; IL: interleucina; IFN- $\gamma$ : interferon- $\gamma$ ; TNF- $\alpha$ : fator de necrose tumoral- $\alpha$

## 5 DISCUSSÃO

Atualmente existe uma preocupação em relação ao consumo excessivo de AF pela população, seja pela ingestão de alimentos fortificados, ou pelo uso de suplementos e medicamentos contendo doses elevadas desta vitamina. Além disso, resultados de estudos anteriores de nosso grupo tem mostrado que o excesso de AF poderia ter alguma implicação sobre o sistema imune.

Nos 34 indivíduos saudáveis incluídos nessa fase do estudo, as concentrações de folato sérico, eritrocitário, bem como as concentrações de 5-metil-THF e folato total apresentaram aumento significativo após o uso de 5mg/dia de AF por 45 e 90 dias. Este resultado é muito similar àquele observado em estudo anterior de nosso grupo, com um grupo de 30 indivíduos saudáveis, submetidos às mesmas condições experimentais e onde se observou aumento significativo das concentrações de folato sérico, 5-metil-THF e folato total após o uso diário de 5 mg de AF (Paniz *et al.*, 2017). A forma 5-metil-THF é a forma predominante de folato no plasma. A. Em nosso estudo a proporção de 5-metil-THF foi de cerca de 85% do folato total. Resultados semelhantes foram descritos na população norte-americana. (Pfeiffer *et al.*, 2015).

As concentrações de UMFA foram realizadas em outro equipamento, com limites de detecção inferiores o que impediu comparações em relação às concentrações de UMFA no *baseline*. Nas análises realizadas após 45 e 90 dias de uso de 5mg/dia de AF, as concentrações de UFMA foram maiores e assim detectáveis, demonstrando que o uso de 5mg/dia de AF levou ao aparecimento e aumento das concentrações de UMFA na circulação destes indivíduos. Apesar disso, demonstramos mais uma vez que a ingestão de doses altas como 5mg diariamente leva ao aparecimento de UMFA no organismo de indivíduos saudáveis. Em nosso país, um estudo realizado por nosso grupo, com 144 indivíduos saudáveis, submetidos apenas à fortificação obrigatória dos alimentos, concentrações séricas detectáveis de UMFA ( $\leq 2$  nmol/L) foram encontradas em todos os participantes, provavelmente como resultado da ingestão de AF a partir de alimentos fortificados (Palchetti *et al.*,

2017). Acreditamos que as concentrações mais baixas observadas no *baseline* do presente estudo sejam devido mais a questões metodológicas do que a diferenças de concentrações neste grupo.

Com relação a deficiência desta vitamina, é bem descrito que ela pode ser causa de diversos problemas de saúde, entre os quais os DFTN e outros distúrbios durante a gestação, aumento de Hcy e alterações na metilação do DNA, ocasionando hipometilação de alguns genes (Ulrich and Potter, 2006; Liu *et al.*, 2007; Smith *et al.*, 2008). Entretanto, as necessidades diárias desta vitamina, em indivíduos saudáveis, são normalmente supridas pelo consumo alimentar em uma dieta adequada. Para evitar a deficiência de folato, a Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda a ingestão diária de até 400 µg, independente que seja de origem natural ou de alimentos fortificados e suplementos. Em nosso estudo a frequência de indivíduos com deficiência de folato eritrocitário no *baseline* foi de 8,8% sugerindo que a fortificação pode ainda estar sendo insuficiente para resolver todos os casos de deficiência na população. Um estudo transversal realizado no Canadá em 2016 avaliou o consumo de folato de origem natural e sintética e concluiu que o consumo avaliado através de questionários nutricionais foi adequado, segundo as recomendações da OMS. Neste estudo canadense, quando mensuradas as concentrações de folato eritrocitário, a deficiência de folato foi menor que 1% (Mudryj *et al.*, 2016).

A fortificação de alimentos, de modo geral, trouxe diversos benefícios, especialmente a redução nas taxas de DFTN. Entretanto, o uso de concentrações muito elevadas de AF, como as que são comercializadas no Brasil (a grande maioria na formulação de 5mg), consumida por pacientes com anemias hemolíticas de modo crônico, por gestantes e também pela população em geral, causa preocupação. A circulação por longos períodos no organismo de uma molécula sintética como o AF poderia ter implicações variáveis e poderia ter algum efeito sobre o sistema imune (Troen *et al.*, 2006; Paniz *et al.*, 2017).

Em estudos anteriores a este, nosso grupo associou o uso diário de 5 mg de AF por indivíduos saudáveis ao aumento das concentrações séricas de folato e UMFA, bem como à diminuição da capacidade citotóxica das células

NK e ao aumento da expressão de RNAm do gene da *DHFR*, *IL8* e *TNFA* em leucócitos mononucleares. O aumento da expressão dessas duas citocinas após o uso de AF indica uma possível relação entre altas concentrações de AF e o sistema imune. A fim de entender melhor os efeitos da intervenção diária com 5 mg de AF, este estudo avaliou outros aspectos do sistema imune, como a ativação e proliferação de linfócitos.

De nosso conhecimento, este é o primeiro estudo que avaliou a ativação de linfócitos T e B em resposta a concentrações elevadas de AF. A ativação de linfócitos é uma cascata de eventos complexa, extremamente regulada, que resulta na expressão de várias moléculas de superfície, que eventualmente levam a respostas imunes divergentes.

Quando avaliamos a proliferação de linfócitos observamos que o uso de AF durante 90 dias levou a um aumento no número de eventos de Linfócitos T CD4+ e redução de T CD8+. Além disso, observamos que o uso de AF mostrou uma tendência para diminuição do número de eventos de Linfócitos B, ainda que não estatisticamente significativa. Esta diferença não foi observada quando o ensaio de proliferação foi repetido antes e após a intervenção, nas células estimuladas com PMA e ionomicina. Apesar disto, os marcadores de ativação (CD38 e HLA-DR) apresentaram alterações com o uso de AF. Este achado demonstra que mesmo que o uso de AF associado ao estímulo não tenha contribuído para uma alteração na proliferação destas células, ele pode estar envolvido em algum mecanismo durante a ativação das mesmas. Este resultado pode indicar que o uso de altas doses de AF poderia estar relacionado com a ativação de linfócitos apenas em condições patológicas em que há necessidade de ativação linfocitária, por exemplo.

A deficiência de folato nos linfócitos T ativados por fito-hemaglutinina cultivada (PHA) é capaz de reduzir a proliferação de linfócitos T, induzir apoptose e aumentar a razão CD4/CD8 devido a uma redução acentuada da proliferação de células CD8 (Courtemanche *et al.*, 2004; Field *et al.*, 2006). Em nosso estudo observou-se um aumento na razão CD4/CD8 após 90 dias de uso de ácido fólico. Em nosso estudo a razão CD4/CD8 aumentou, devido ao

aumento de Linfócitos CD4 e uma diminuição dos CD8. A diminuição de linfócitos TCD8 pode levar a uma menor resistência a infecções.

A estimulação de linfócitos leva à regulação positiva de vários marcadores de superfície celular em vários estágios de ativação celular, como CD69 (precoce) e HLA-DR (muito tardia) (Ferenczi *et al.*, 2000). Em nosso estudo, foi observada redução do número de eventos LB/HLA-DR+ estimulados por PMA e ionomicina após 45 dias de uso do AF em comparação ao baseline, o que sugere uma redução da ativação de linfócitos B. Em estudo de Forestier *et al.*, 2018, foi demonstrado que portadores de esclerose sistêmica apresentavam aumento da expressão de HLA-DR em determinadas populações de células B, quando comparado a indivíduos controle (Forestier *et al.*, 2018). A deficiência de HLA-DR em seres humanos tem como principal característica clínica uma maior propensão para desenvolvimento de infecções bacterianas, virais e fúngicas severas e recorrentes

A contagem reduzida de células NK e moléculas de HLA-DR nos linfócitos B parece fazer parte de um desvio imunológico associado ao desenvolvimento de sepse grave (Ditschkowski *et al.*, 1999). Outros estudos também observaram associação entre severidade e pior prognóstico de septicemia e a baixa expressão de HLA-DR em monócitos (Lelubre *et al.*, 2017; Cajander *et al.*, 2018). Além do mais, a expressão constitutiva dessa molécula é limitada às células apresentadoras de antígeno (APC), que englobam macrófagos, células B e células dendríticas e aparece mais tardiamente em estágios de ativação nos linfócitos T e NK (Mach *et al.*, 1996; Holling *et al.*, 2002). As APCs utilizam HLA-DR para apresentar antígenos às células T CD4<sup>+</sup>, e consequentemente, essa proteína está envolvida em vários aspectos da homeostase da resposta imune, como ativação de células T, tolerância periférica e indução de apoptose (Gotsman *et al.*, 2008).

Em nosso ensaio obtivemos um achado importante, na avaliação do número de eventos de linfócitos B/HLA-DR+. Após 45 dias de uso de AF, os indivíduos saudáveis tiveram aumento no número de eventos de linfócitos B/CD69+, que não se manteve após 90 dias de uso de AF. Reddy e colaboradores fizeram um estudo de análise comparativa da expressão de

marcadores de ativação de linfócitos. No tratamento com PMA + ionomicina, foi observado uma forte indução de todos os marcadores de ativação testados em PBMC. Houve uma rápida indução do CD69 já às 3 horas com pico de expressão às 12 horas que foi estável até 24 horas e declinou em 48 e 72 horas (Reddy *et al.*, 2004). Em nosso estudo, onde incubamos os PBMC com PMA + ionomicina por 18 horas, na análise de linfócitos B, marcados com CD69 não se observou diferenças quando comparamos o período anterior e posterior a uso de AF.

No ensaio controle, sem ativação, observou-se uma diminuição da marcação de CD69 após 45 dias de uso de AF, essa redução manteve-se após 90 dias. Como o CD69 é um marcador de ativação precoce, nas células NK sem ativação marcados com CD69 tivemos uma redução considerável no número de indivíduos avaliados, uma vez que a marcação foi muito pequena após as 18 horas de tratamento com PMA e ionomicina. Os linfócitos do sangue periférico têm pouca expressão basal de CD69, mas a estimulação destes por ésteres de forbol provoca rápida indução (2–3 h) deste marcador em linfócitos T, B e NK. Estudos apontam que o CD69 é um regulador da migração linfocitária e promotor da retenção de células T nos linfonodos e em todo o corpo. Após a ativação, os linfócitos T expressam CD69 e são retidos transitoriamente nos linfonodos, provavelmente favorecendo sua ativação total (Cibrián and Sánchez-Madrid, 2017).

Nossos resultados demonstraram redução no número de eventos de células NK/CD38+ ativadas nos indivíduos saudáveis após 90 dias de uso de AF. O aumento da expressão de CD38 em células NK foi associado a menor resposta a antirretrovirais e a progressão da doença em pacientes infectados pelo HIV (Kuri-Cervantes *et al.*, 2014; Luo *et al.*, 2017). Pacientes com hepatite B crônica sem tratamento também apresentaram maior expressão de CD38 em células NK quando comparado a indivíduos controle (Boni *et al.*, 2015).

Em relação ao uso de AF e as concentrações séricas de citocinas, um estudo realizado em indivíduos com sobrepeso demonstrou que o AF exerce efeitos anti-inflamatórios, como a redução das concentrações séricas de IL-8 (Solini *et al.*, 2006). Ma e colaboradores (2016), observaram que indivíduos que fizeram o uso de 400µg de AF por um período de 12 meses obtiveram redução



nas concentrações séricas de IL-6 e TNF- $\alpha$ , juntamente com a redução das concentrações de tHcy (Ma *et al.*, 2016). Em nosso estudo o uso de 5 mg/dia de AF não influenciou a concentração sérica das citocinas IL-6, IL-8, IL-10, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ .

A IL-8 é conhecida como “citocina quimiotática”, agindo como mediador do recrutamento de células para o local da infecção. Em nosso estudo a expressão de mRNA de IL-8 diminuiu após 90 dias de uso de AF. Essa redução observada na expressão do gene da IL-8 sugere que o uso de 5mg/dia de AF por um período maior, poderiam também levar a uma diminuição das concentrações séricas desta citocina, o que seria prejudicial a resposta imune, devido a função desta citocina.

Utilizando modelos de regressão linear univariada, encontramos alguns achados interessantes em relação as concentrações séricas das citocinas. Quando considerado o grupo total (*baseline*, após 45 e 90 dias de uso de 5mg/dia de AF), o aumento nas concentrações de IFN- $\gamma$  foi diretamente associado ao aumento de eventos de células NK sem ativação. As células NK são as maiores produtoras de algumas citocinas tais como IFN- $\gamma$ , em várias condições fisiológicas e patológicas. São responsáveis pela produção de citocinas inflamatórias e imunossupressoras, como o TNF- $\alpha$  e IL-10 (Vivier *et al.*, 2011). Desta forma, as concentrações de IFN- $\gamma$  influenciam indiretamente as concentrações de outras citocinas.

Ainda utilizando modelos de regressão linear univariado, observamos que as concentrações de IFN- $\gamma$  foram associados positivamente número de eventos dos linfócitos T CD8+ não ativados. Os linfócitos T CD4+ apresentam funções auxiliaadoras, produzindo citocinas que modulam a função das células T CD8+ citotóxicas ou monócitos macrófagos que efetuam a lise das células-alvo infectadas, e a ativação de células B na produção de diferentes classes de anticorpos (Janeway, 2001)

As principais limitações deste estudo são o reduzido número de indivíduos que participaram e o limitado tempo de estudo. Mesmo assim, foi possível demonstrar que o uso de altas concentrações de folato leva ao aparecimento de UFMA na circulação dos indivíduos e que existem indícios

que isso possa estar envolvido no processo de ativação de algumas células do sistema imune. Nossos achados sugerem que o uso de doses excessivas de AF poderia levar a pior resposta de ativação de células linfocitárias aumentando a propensão para infecções nestes indivíduos. De qualquer forma, são necessários estudos mais aprofundados, com número maior de indivíduos e com acompanhamento por tempo maior para confirmar tais suspeitas.

Esses achados sugerem a necessidade de uma avaliação mais cuidadosa dos riscos e benefícios do uso de suplementos de AF por pacientes com anemias hemolíticas de modo crônico, por gestantes ou até mesmo pela população em geral, devido ao crescente aumento no uso indiscriminado de polivitamínicos.

## 6 CONCLUSÃO

De modo geral, muitos dos achados obtidos neste estudo reproduziram dados previamente descritos em nosso grupo em relação as concentrações de folato e o uso de AF. Por outro lado, foram obtidos novos dados, na intenção de melhorar o entendimento de um possível papel do uso de altas doses de AF sobre a ativação e proliferação de linfócitos na regulação do sistema imune. São eles:

- ✓ Houve aumento dos Linfócitos T CD4+ e diminuição de Linfócitos TCD8+ dos indivíduos submetidos ao uso de 5 mg/dia de AF, e consequentemente um aumento da razão CD4/CD8 após 90 dias de uso de AF;
- ✓ O uso de 5mg/dia de AF levou a um aumento nas concentrações séricas de folato e consequentemente o aparecimento de UMFA na circulação dos indivíduos saudáveis que fizeram uso desta vitamina;
- ✓ Houve diminuição no número de Linfócitos B/HLA-DR+ e de células NK/CD 38+ estimuladas com PMA e ionomicina nos indivíduos saudáveis após uso de 5mg/dia de AF;
- ✓ Houve diminuição dos linfócitos T CD8/CD 38+ após a 90 dias de intervenção com AF;
- ✓ As células NK e os linfócitos TCD8+ influenciaram positivamente as concentrações de IFN- $\gamma$ .
- ✓ A expressão de mRNA de IL-8 diminuiu após 90 dias de uso de AF.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, I. et al. Folate-deficiency induced cell-specific changes in the distribution of lymphocytes and granulocytes in rats. **Environ Health Prev Med**, v. 18, n. 1, p. 78-84, Jan 2013. ISSN 1347-4715. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22644659> >.

ASHOKKUMAR, B. et al. Effect of folate oversupplementation on folate uptake by human intestinal and renal epithelial cells. **Am J Clin Nutr**, v. 86, n. 1, p. 159-66, Jul 2007. ISSN 0002-9165. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17616776> >.

ASSEMAN, C. et al. An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. **J Exp Med**, v. 190, n. 7, p. 995-1004, Oct 1999. ISSN 0022-1007. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10510089> >.

BONI, C. et al. Natural killer cell phenotype modulation and natural killer/T-cell interplay in nucleos(t)ide analogue-treated hepatitis e antigen-negative patients with chronic hepatitis B. **Hepatology**, v. 62, n. 6, p. 1697-709, Dec 2015. ISSN 1527-3350. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26361374> >.

BOWER, C.; STANLEY, F. J. Dietary folate as a risk factor for neural-tube defects: evidence from a case-control study in Western Australia. **Med J Aust**, v. 150, n. 11, p. 613-9, Jun 1989. ISSN 0025-729X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2725375> >.

BRASIL. **Resolução RDC nº 344, de 13 de dezembro de 2002: Aprova o Regulamento Técnico para a Fortificação das Farinhas de Trigo e das Farinhas de Milho com Ferro e Ácido Fólico , constante do anexo desta Resolução.** Brazilian: Ministério da Saúde. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2002.

\_\_\_\_\_. **Dispõe sobre o enriquecimento das farinhas de trigo e**

**de milho com ferro e ácido fólico.** Brasília: Ministério da Saúde. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2017.

BRITTO, J. C.; CANÇADO, R.; GUERRA-SHINOHARA, E. M. Concentrations of blood folate in Brazilian studies prior to and after fortification of wheat and cornmeal (maize flour) with folic acid: a review. **Rev Bras Hematol Hemoter**, v. 36, n. 4, p. 275-86, 2014 Jul-Aug 2014. ISSN 1516-8484. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25031167> >.

BÖYUM, A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. **Scand J Clin Lab Invest Suppl**, v. 97, p. 77-89, 1968. ISSN 0085-591X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4179068> >.

CARROLL, N. et al. Analysis of the MTHFD1 promoter and risk of neural tube defects. **Hum Genet**, v. 125, n. 3, p. 247-56, Apr 2009. ISSN 1432-1203. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19130090> >.

CAUDILL, M. A. Folate bioavailability: implications for establishing dietary recommendations and optimizing status. **Am J Clin Nutr**, v. 91, n. 5, p. 1455S-1460S, May 2010. ISSN 1938-3207. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20219964> >.

CIBRIÁN, D.; SÁNCHEZ-MADRID, F. CD69: from activation marker to metabolic gatekeeper. **Eur J Immunol**, v. 47, n. 6, p. 946-953, 06 2017. ISSN 1521-4141. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28475283> >.

COURTEMANCHE, C. et al. Folate deficiency inhibits the proliferation of primary human CD8+ T lymphocytes in vitro. **J Immunol**, v. 173, n. 5, p. 3186-92, Sep 2004. ISSN 0022-1767. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15322179> >.

CRONKITE, D. A.; STRUTT, T. M. The Regulation of Inflammation by Innate and Adaptive Lymphocytes. **J Immunol Res**, v. 2018, p. 1467538, 2018. ISSN 2314-7156. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29992170> >.

DARY, O. Nutritional interpretation of folic acid interventions. **Nutr Rev**, v. 67, n. 4, p. 235-44, Apr 2009. ISSN 1753-4887. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19335717> >.

DEAGLIO, S. et al. CD38/CD31, a receptor/ligand system ruling adhesion and signaling in human leukocytes. **Chem Immunol**, v. 75, p. 99-120, 2000. ISSN 1015-0145. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10851781> >.

\_\_\_\_\_. Human CD38 and CD16 are functionally dependent and physically associated in natural killer cells. **Blood**, v. 99, n. 7, p. 2490-8, Apr 2002. ISSN 0006-4971. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11895784> >.

DHUR, A.; GALAN, P.; HERCBERG, S. Folate status and the immune system. **Prog Food Nutr Sci**, v. 15, n. 1-2, p. 43-60, 1991. ISSN 0306-0632. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1887065> >.

DONALDSON, T. A. Immune responses to infection. **Crit Care Nurs Clin North Am**, v. 19, n. 1, p. 1-8, Mar 2007. ISSN 0899-5885. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17338944> >.

EICHHOLZER, M.; TÖNZ, O.; ZIMMERMANN, R. Folic acid: a public-health challenge. **Lancet**, v. 367, n. 9519, p. 1352-61, Apr 2006. ISSN 1474-547X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16631914> >.

FARBER, D. L. et al. Immunological memory: lessons from the past and a look to the future. **Nat Rev Immunol**, v. 16, n. 2, p. 124-8, 02 2016. ISSN 1474-1741. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26831526> >.

FIELD, C. J. et al. Dietary folate improves age-related decreases in lymphocyte function. **J Nutr Biochem**, v. 17, n. 1, p. 37-44, Jan 2006. ISSN 0955-2863. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16098728> >.

GOMES, S.; LOPES, C.; PINTO, E. Folate and folic acid in the periconceptional period: recommendations from official health organizations in thirty-six countries worldwide and WHO. **Public Health Nutr**, v. 19, n. 1, p. 176-89, Jan 2016. ISSN 1475-2727. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25877429> >.

GUERRA-SHINOHARA, E. M. **Bases moleculares de alterações no metabolismo de ácido fólico, cobalamina e ferro**. 2012. 126 (Livre Docência). USP, São Paulo-SP.

GUERRA-SHINOHARA, E. M. et al. Elevated serum S-adenosylhomocysteine in cobalamin-deficient megaloblastic anemia. **Metabolism**, v. 56, n. 3, p. 339-47, Mar 2007. ISSN 0026-0495. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17292722> >.

HIRAYAMA, C. et al. Constitutive overexpression of P-glycoprotein, rather than breast cancer resistance protein or organic cation transporter 1, contributes to acquisition of imatinib-resistance in K562 cells. **Pharm Res**, v. 25, n. 4, p. 827-35, Apr 2008. ISSN 0724-8741. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17934801> >.

HOLLER, P. D.; KRANZ, D. M. Quantitative analysis of the contribution of TCR/pepMHC affinity and CD8 to T cell activation. **Immunity**, v. 18, n. 2, p. 255-64, Feb 2003. ISSN 1074-7613. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12594952> >.

HUM, D. W. et al. Primary structure of a human trifunctional enzyme. Isolation of a cDNA encoding methylenetetrahydrofolate dehydrogenase-

methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase-formyltetrahydrofolate synthetase. **J Biol Chem**, v. 263, n. 31, p. 15946-50, Nov 1988. ISSN 0021-9258. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3053686> >.

IMAI, K. et al. Natural cytotoxic activity of peripheral-blood lymphocytes and cancer incidence: an 11-year follow-up study of a general population. **Lancet**, v. 356, n. 9244, p. 1795-9, Nov 2000. ISSN 0140-6736. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11117911> >.

INOUE, K. et al. Functional characterization of PCFT/HCP1 as the molecular entity of the carrier-mediated intestinal folate transport system in the rat model. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 294, n. 3, p. G660-8, Mar 2008. ISSN 0193-1857. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18174275> >.

INSTITUTE; MEDICINE, O. **National Academy of Sciences. Dietary reference**

**intakes for thiamin, riboflavin, niacin, vitamin B6, folate, vitamin B12, pantothenic acid, biotin and choline.** Washington, DC: National Academy Press 1998.

JANEWAY, C. A. How the immune system protects the host from infection. **Microbes Infect**, v. 3, n. 13, p. 1167-71, Nov 2001. ISSN 1286-4579. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11709297> >.

KALMBACH, R. D. et al. A 19-base pair deletion polymorphism in dihydrofolate reductase is associated with increased unmetabolized folic acid in plasma and decreased red blood cell folate. **J Nutr**, v. 138, n. 12, p. 2323-7, Dec 2008. ISSN 1541-6100. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19022952> >.

KATIKANENI, D. S.; JIN, L. B cell MHC class II signaling: A story of life and death. **Hum Immunol**, v. 80, n. 1, p. 37-43, Jan 2019. ISSN 1879-1166. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29715484> >.

KIM, Y. I. Role of folate in colon cancer development and progression. **J Nutr**, v. 133, n. 11 Suppl 1, p. 3731S-3739S, Nov 2003. ISSN 0022-3166. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14608107> >.

\_\_\_\_\_. Folate and colorectal cancer: an evidence-based critical review. **Mol Nutr Food Res**, v. 51, n. 3, p. 267-92, Mar 2007. ISSN 1613-4125. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17295418> >.

KURI-CERVANTES, L. et al. Activation of NK cells is associated with HIV-1 disease progression. **J Leukoc Biol**, v. 96, n. 1, p. 7-16, Jul 2014. ISSN 1938-3673. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24399837> >.

KÜHN, R. et al. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. **Cell**, v. 75, n. 2, p. 263-74, Oct 1993. ISSN 0092-8674. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8402911> >.

LAANPERE, M. et al. Folate-mediated one-carbon metabolism and its effect on female fertility and pregnancy viability. **Nutr Rev**, v. 68, n. 2, p. 99-113, Feb 2010a. ISSN 1753-4887. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20137055> >.

\_\_\_\_\_. Folate-mediated one-carbon metabolism and its effect on female fertility and pregnancy viability. **Nutr Rev**, v. 68, n. 2, p. 99-113, Feb 2010b. ISSN 1753-4887. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20137055> >.

LAFTAH, A. H. et al. Haem and folate transport by proton-coupled folate transporter/haem carrier protein 1 (SLC46A1). **Br J Nutr**, v. 101, n. 8, p. 1150-6, Apr 2009. ISSN 1475-2662. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18782461> >.

LAUW, F. N. et al. Proinflammatory effects of IL-10 during human endotoxemia. **J Immunol**, v. 165, n. 5, p. 2783-9, Sep 2000. ISSN 0022-1767. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10946310> >.

LEONARD, E. J. et al. Leukocyte specificity and binding of human neutrophil attractant/activation protein-1. **J Immunol**, v. 144, n. 4, p. 1323-30, Feb 1990. ISSN 0022-1767. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2406341> >.

LEVY, E. M.; ROBERTI, M. P.; MORDOH, J. Natural killer cells in human cancer: from biological functions to clinical applications. **J Biomed Biotechnol**, v. 2011, p. 676198, 2011. ISSN 1110-7251. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21541191> >.

LI, Y.; YIN, Y.; MARIUZZA, R. A. Structural and biophysical insights into the role of CD4 and CD8 in T cell activation. **Front Immunol**, v. 4, p. 206, 2013. ISSN 1664-3224. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23885256> >.

LUO, Z. et al. Increased Natural Killer Cell Activation in HIV-Infected Immunologic Non-Responders Correlates with CD4+ T Cell Recovery after Antiretroviral Therapy and Viral Suppression. **PLoS One**, v. 12, n. 1, p.



e0167640, 2017. ISSN 1932-6203. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28076376> >.

MITCHELL, L. E. et al. Spina bifida. **Lancet**, v. 364, n. 9448, p. 1885-95, 2004 Nov 20-26 2004. ISSN 1474-547X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15555669> >.

MORRIS, M. S. et al. Circulating unmetabolized folic acid and 5-methyltetrahydrofolate in relation to anemia, macrocytosis, and cognitive test performance in American seniors. **Am J Clin Nutr**, v. 91, n. 6, p. 1733-44, Jun 2010. ISSN 1938-3207. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20357042> >.

NAZER, J.; LÓPEZ-CAMELO, J.; CASTILLA, E. E. [ECLAMC: 30-year study of epidemiological surveillance of neural tube defects in Chile and Latin America]. **Rev Med Chil**, v. 129, n. 5, p. 531-9, May 2001. ISSN 0034-9887. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11464535> >.

NEUHOUSER, M. L.; BERESFORD, S. A. Folic acid: are current fortification levels adequate? **Nutrition**, v. 17, n. 10, p. 868-72, Oct 2001. ISSN 0899-9007. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11684394> >.

NONAKA, M. et al. GM-CSF, IL-8, IL-1R, TNF-alpha R, and HLA-DR in nasal epithelial cells in allergic rhinitis. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 153, n. 5, p. 1675-81, May 1996. ISSN 1073-449X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8630619> >.

OBEID, R.; HOLZGREVE, W.; PIETRZIK, K. Is 5-methyltetrahydrofolate an alternative to folic acid for the prevention of neural tube defects? **J Perinat Med**, v. 41, n. 5, p. 469-83, Sep 2013. ISSN 1619-3997. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23482308> >.

OMS. **Diretriz: Suplementação diária de ferro e ácido fólico em gestantes**. Genebra: Organização Mundial da Saúde 2013.

PANIZ, C. et al. A Daily Dose of 5 mg Folic Acid for 90 Days Is Associated with Increased Serum Unmetabolized Folic Acid and Reduced Natural Killer Cell Cytotoxicity in Healthy Brazilian Adults. **J Nutr**, v. 147, n. 9, p. 1677-1685, 09 2017. ISSN 1541-6100. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28724658> >.

\_\_\_\_\_. Daily supplementation with 5 mg of folic acid in Brazilian patients with hereditary spherocytosis. **J Investig Med**, May 2019. ISSN 1708-8267. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31076457> >.

PARLE-MCDERMOTT, A. et al. A polymorphism in the MTHFD1 gene increases a mother's risk of having an unexplained second trimester pregnancy loss. **Mol Hum Reprod**, v. 11, n. 7, p. 477-80, Jul 2005. ISSN 1360-9947. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16123074> >.

PARTEARROYO, T. et al. Vitamin B(12) and folic acid imbalance modifies NK cytotoxicity, lymphocytes B and lymphoproliferation in aged rats. **Nutrients**, v. 5, n. 12, p. 4836-48, Nov 2013. ISSN 2072-6643. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24288024> >.

PFEIFFER, C. M. et al. Determination of folate vitamers in human serum by stable-isotope-dilution tandem mass spectrometry and comparison with radioassay and microbiologic assay. **Clin Chem**, v. 50, n. 2, p. 423-32, Feb 2004. ISSN 0009-9147. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14670827> >.

PIYATHILAKE, C. J.; ROBINSON, C. B.; CORNWELL, P. A practical approach to red blood cell folate analysis. **Anal Chem Insights**, v. 2, p. 107-10, 2007. ISSN 1177-3901. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19662184> >.

QUINTIN, J. et al. Innate immune memory: towards a better understanding of host defense mechanisms. **Curr Opin Immunol**, v. 29, p. 1-7, Aug 2014. ISSN 1879-0372. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24637148> >.

RAPHAEL, I. et al. T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases. **Cytokine**, v. 74, n. 1, p. 5-17, Jul 2015. ISSN 1096-0023. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25458968> >.

REFAELI, Y. et al. Interferon gamma is required for activation-induced death of T lymphocytes. **J Exp Med**, v. 196, n. 7, p. 999-1005, Oct 2002. ISSN 0022-1007. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12370261> >.

ROMAGNÉ, F.; VIVIER, E. Natural killer cell-based therapies. **F1000 Med Rep**, v. 3, p. 9, 2011. ISSN 1757-5931. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21654924> >.

SELHUB, J.; PAUL, L. Folic acid fortification: why not vitamin B12 also? **Biofactors**, v. 37, n. 4, p. 269-71, 2011 Jul-Aug 2011. ISSN 1872-8081. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21674649> >.

SINAGRA, E. et al. Heart failure and anti tumor necrosis factor-alpha in systemic chronic inflammatory diseases. **Eur J Intern Med**, v. 24, n. 5, p. 385-

92, Jul 2013. ISSN 1879-0828. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23333028> >.

SMITH, A. D.; KIM, Y. I.; REFSUM, H. Is folic acid good for everyone? **Am J Clin Nutr**, v. 87, n. 3, p. 517-33, Mar 2008. ISSN 1938-3207. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18326588> >.

SWEENEY, M. R. et al. Measurements of sub-nanomolar concentrations of unmetabolised folic acid in serum. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci**, v. 788, n. 1, p. 187-91, May 2003. ISSN 1570-0232. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12668084> >.

TALAULIKAR, V. S.; ARULKUMARAN, S. Folic acid in obstetric practice: a review. **Obstet Gynecol Surv**, v. 66, n. 4, p. 240-7, Apr 2011. ISSN 1533-9866. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21756406> >.

TROEN, A. M. et al. Unmetabolized folic acid in plasma is associated with reduced natural killer cell cytotoxicity among postmenopausal women. **J Nutr**, v. 136, n. 1, p. 189-94, Jan 2006. ISSN 0022-3166. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16365081> >.

ULRICH, C. M.; POTTER, J. D. Folate supplementation: too much of a good thing? **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 15, n. 2, p. 189-93, Feb 2006. ISSN 1055-9965. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16492904> >.

VAN DER LINDEN, I. J. et al. Genetic variation in genes of folate metabolism and neural-tube defect risk. **Proc Nutr Soc**, v. 65, n. 2, p. 204-15, May 2006. ISSN 0029-6651. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16672082> >.

VANDESOMPELE, J. et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biol**, v. 3, n. 7, p. RESEARCH0034, Jun 2002. ISSN 1465-6914. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12184808> >.

VIVIER, E. et al. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. **Science**, v. 331, n. 6013, p. 44-9, Jan 2011. ISSN 1095-9203. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21212348> >.

\_\_\_\_\_. Functions of natural killer cells. **Nat Immunol**, v. 9, n. 5, p. 503-10, May 2008. ISSN 1529-2916. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18425107> >.

XU, X. et al. A functional 19-base pair deletion polymorphism of dihydrofolate reductase (DHFR) and risk of breast cancer in multivitamin users. **Am J Clin Nutr**, v. 85, n. 4, p. 1098-102, Apr 2007. ISSN 0002-9165. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17413111> >.

YAO, X. et al. Targeting interleukin-6 in inflammatory autoimmune diseases and cancers. **Pharmacol Ther**, v. 141, n. 2, p. 125-39, Feb 2014. ISSN 1879-016X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24076269> >.

ZENG, H. et al. Type 1 regulatory T cells: a new mechanism of peripheral immune tolerance. **Cell Mol Immunol**, v. 12, n. 5, p. 566-71, Sep 2015. ISSN 2042-0226. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26051475> >.

ZHANG, C.; ZHANG, X.; CHEN, X. H. Inhibition of the interleukin-6 signaling pathway: a strategy to induce immune tolerance. **Clin Rev Allergy Immunol**, v. 47, n. 2, p. 163-73, Oct 2014. ISSN 1559-0267. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24647663> >.

ZHAO, R.; MATHERLY, L. H.; GOLDMAN, I. D. Membrane transporters and folate homeostasis: intestinal absorption and transport into systemic compartments and tissues. **Expert Rev Mol Med**, v. 11, p. e4, 2009. ISSN 1462-3994. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19173758> >.